

ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUN 24 '64

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN LYNGBY	C. B. VAN NIEL PACIFIC GROVE	R. NILSSON UPPSALA
G. PIEKARSKI BONN	E. G. PRINGSHEIM GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE	W. H. SCHOPFER BERN
H. TAMIYA TOKIO	T. WIKÉN DELFT	

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES GÖTTINGEN	R. HARDER GÖTTINGEN
-------------------------------	------------------------

29. BAND · 1. HEFT

MIT 45 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 17. FEBRUAR 1958)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1958

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930
von J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. H. L. Jensen, Lyngby/Dänemark, Statens Planteavlslaboratorium, Bakteriologisk Afdeling,

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. G. Piekarski, Bonn/Rh., Venusberg, Hygienisches Institut (medizinisch-parasitologische Abteilung) der Universität,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

Prof. Dr. T. Wikén, Delft/Holland, Nieuwe Laan 5, Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hogeschool

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Untere Karspüle 2

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

29. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Seite

PREUSSER, H.-J., Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Begeißelung von <i>Proteus vulgaris</i> . Mit 11 Textabbildungen	1
PREUSSER, H.-J., Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Cyto- logie von <i>Proteus vulgaris</i> . Mit 16 Textabbildungen	17
SUSSMAN, A., R. HOLTON and B. v. BÖVENTER-HEIDENHAIN, Physiology of the Cell Surface of <i>Neurospora</i> Ascospores. Entrance of anions and non-polar compounds. With 8 Figures in the text	38
FUHS, G. W., Enzymatischer Abbau der Membranen von <i>Oscillatoria amoena</i> (Kütz.) Gomont mit Lysozym. Mit 1 Textabbildung	51
GLADTKE, E., und W. BRUCKER, Über die Ansäuerung der Nährflüssigkeit durch <i>Phycomyces blakesleanus</i> . Mit 7 Textabbildungen	53
KÄRBER, M., Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hefezelle. Mit 1 Textabbildung	65
PFENNIG, N., Untersuchungen über extracelluläre Schleimsubstanzen von <i>Streptomyces spec.</i> Mit 1 Textabbildung	90

(Aus dem Mikrobiologischen und dem Zoologischen Institut
der Universität Göttingen)

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Begeißelung von *Proteus vulgaris**

Von
H.-J. PREUSSER

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. September 1957)

Durch spezifische Färbungen gelang es ZETTNOW, PEPPLER, NERI u. a., bei beweglichen Bakterien lange, fadenförmige Anhängsel, Geißeln genannt, sichtbar zu machen. Mit der Entwicklung der Dunkelfeldtechnik durch REICHERT (1909) war es möglich, Geißeln auch an lebenden, sich fortbewegenden Zellen zu beobachten.

An relativ langen Zellen von *Proteus vulgaris* und an verschiedenen anderen Bakterien konnte NEUMANN (1925, 1928) nach Färbung eine besonders starke Begeißelung nachweisen. Kurze Zellen desselben Stammes dagegen besaßen oftmals nur zwei Geißeln, welche dann seitlich der beiden Pole (subpolar) inseriert waren. Dieser Befund wurde von ihm, PIJPER (1930, 1938, 1946, 1947) und PIETSCHMANN (1939, 1942) durch Untersuchung lebender Objekte im Dunkelfeld weiter ausgebaut. Dabei zeigte sich nach Zusatz stark viscöser Substanzen (Methylcellulose, Gummiarabicum, Tragant), die die Geißelbewegung verlangsamen, daß von den langen Schwärmzellen in regelmäßigen Abständen hell aufleuchtende, sich wellenförmig bewegende Fäden rechts und links abgingen. Da die Geißelabstände an Schwärmern der Länge subpolar begeißelter kurzer Einzelzellen zu entsprechen schienen, sollte ein Schwärmer vielleicht als Einheit zahlreicher, kettenförmig angeordneter, nicht geteilter Einzelzellen aufzufassen sein (RIPPEL-BALDES 1947).

Es wäre denkbar, daß der Widerspruch zwischen den durch Färbung gewonnenen Ergebnissen und den Dunkelfeldbildern auf Artefakte, die während des Färbeganges zustande kommen, zurückgeführt werden kann. Jede Geißel, die im Dunkelfeld sichtbar wird, müßte dann aus einer Anzahl von Fibrillen bestehen, die sich bei der Präparation entflechten und so die starke Begeißelung der gefärbten Schwärmzellen hervorrufen. Dann müßte sich aber für jede Gruppe von Fibrillen ein gemeinsamer

* Teilergebnisse aus der Dissertation „Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie und Cytologie von *Proteus vulgaris*“ der Mathem.-Naturwiss. Fakultät der Universität Göttingen 1957.

Insertionspunkt finden lassen. Übermikroskopische Bilder von PIEKARSKI u. RUSKA (1939) sowie HOUWINK u. VAN ITERSSEN (1950) zeigen, daß Schwärmzellen wie die von *Proteus* sehr viel mehr Geißeln besitzen, als die Beobachtungen im Dunkelfeld erwarten lassen. Für Geißelbüschel fand sich in ihren Bildern indessen kein Anhalt. Die Autoren kamen auf Grund ihrer Aufnahmen zu der Überzeugung, daß die Schwärmzellen von *Proteus* peritrich begeißelt seien.

Demnach kann die geringe Anzahl von Geißeln, die das Dunkelfeldbild zeigt, nur so erklärt werden, daß die sehr dünnen Einzelgeißeln jeweils in Gruppen synchron zusammenarbeiten, sich bündeln und so bei Lebendbeobachtung nur wenige Fäden erkennen lassen.

Es stehen sich damit zwei sehr verschiedene Ansichten gegenüber: Entweder die Schwärmzellen sind peritrich begeißelt, oder sie bestehen aus einer sehr großen Zahl extrem kurzer, kettenförmig angeordneter und nicht geteilter, jeweils subpolar begeißelter Einzelzellen. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Hypothesen ist möglich, wenn es gelingt, den Begriff „Einzelzelle“ streng zu fassen und Methoden zu entwickeln, die das Zählen von Einzelzellen in Schwärmen mit Sicherheit gestatten.

A. Untersuchungen an Plattenkulturen

1. Methodik

Untersucht wurde *Proteus vulgaris*, Stamm 556, aus dem Hygiene-Institut der Universität Göttingen¹.

Für Plattenkulturen fanden zwei verschiedene Nährböden Verwendung, die beide für die Ausbildung einer Schwärmzone bei *Proteus* gut geeignet waren: a) Pepton-Fleischextrakt-Agar (Pepton S 1%; Liebig's Fleischextrakt 1%; NaCl 0,5%; Agar 1,5%; aqua dest.). Der Nährboden wurde mit der von BIRCH-ANDERSEN, MAALØE u. SJÖSTRAND (1953) angegebenen Salzlösung auf pH 7,2 gepuffert. Dazu ist von dieser Lösung etwa 1 cm³ je 100 cm³ Nährlösung notwendig. — b) Synthetischer (asparaginhaltiger) Nähragar nach BELOSERSKI (1939).

Die Agarplatten wurden mit Zellen aus 24 Std bei 37° C bebrüteten Agar-Schrägröhrchen in der Plattenmitte punktförmig beimpft und bei 37° C kultiviert.

An Ausstrichen wurden mit Hilfe eines geeichten Mikrometeroculars die Längen der Bakterien im Phasenkontrast ausgemessen. Optik: Leitz Fluorit (Öl) 70/1,15, Periplan-Ocular 10×. Die Streuung aller in dieser Arbeit angegebenen Meßwerte wird durch den einfachen mittleren Fehler des Mittelwertes ausgedrückt.

Färbungen nach FEULGEN an Deckglas-Abklatschpräparaten erfolgten nach vorangehender Fixation (2 Std) in einer mit OsO₄-Dampf gesättigten feuchten Kammer über 1% iger OsO₄-Lösung. Fixationstemperatur + 2° C, um Autolyse in den Bakterien einzuschränken. Nach Auswaschen in der von BIRCH-ANDERSEN, MAALØE u. SJÖSTRAND (1953) angegebenen Salzlösung wurden die Objekte 1,5 Std in 70% igem Alkohol belassen. 15 min Hydrolyse bei 60° C in 1 n HCl lieferte die Nucleoide am klarsten. Weiterbehandlung der Präparate in üblicher Weise.

Für lichtmikroskopische Beobachtungen stand ein Leitz-Ortholux-Mikroskop zur Verfügung. Hellfeldoptik: Fluorit (Öl) 95/1,32, Kondensor n. A. 1,4, Periplan-

¹ Für die freundliche Überlassung sei auch an dieser Stelle Frau Prof. Dr. A. WINKLER bestens gedankt.

Ocular 10×, Dunkelgrünfilter, schräge Beleuchtung mit Hilfe einer Zusatzblende (Durchmesser 3 mm), die unter dem Kondensor auf die Staubschutzscheibe des Mikroskops gelegt wurde. Für Mikrofotos: Isopan F (Kleinbild).

2. Entwicklungscyclus

Makroskopisch sind in den ersten 2—2½ Std keine Veränderungen innerhalb der Impfzone zu beobachten. 3½—4½ Std nach der Beimpfung wächst der Beimpfungstropfen von etwa 1 mm auf 6 mm; eine starke milchige Trübung läßt auf erhöhte Zellvermehrung schließen. Nach etwa 4stündiger Bebrütung ist vereinzelt am Kolonierand ein bäumchenförmiges Ausschwärmen der Bakterien sichtbar. 6 Std nach Beimpfung ist durch das Schwärmen der Bakterien aus dem Beimpfungstropfen heraus ein dünner Schleier um den Mittelpunkt herum entstanden (Abb. 1). Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Std hat sich der Bakterienrasen in verschiedene ringförmige Zonen unterschiedlicher Zelldichte aufgeteilt (Abb. 2).



Abb. 1. *Proteus vulgaris*.
Beginn der Schwärmpériode¹.
Kultivierungsdauer: 6 Std bei 37°C.

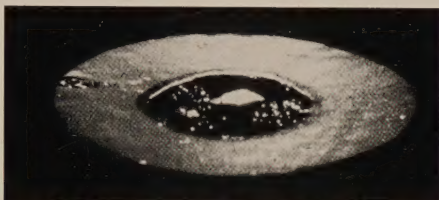


Abb. 2. *Proteus vulgaris*.
Fortgeschrittene Schwärmpériode (Ringbildung).
Kultivierungsdauer: 7 Std bei 37°C.

¹ Die Schwärmzonen lassen sich nur im Gegenlicht abbilden. Der Agar wurde mit schwarzer Tusche angefärbt

9—10 Std nach der Beimpfung ist die Front der Schwärmzone am Plattenrand angekommen. Zu diesem Zeitpunkt kann man insgesamt 6 Zonen unterscheiden.

12—13 Std nach der Beimpfung ist die gesamte Agaroberfläche homogen milchig getrübt.

Dieser Entwicklungscyclus bei *Proteus* ist schon seit langem bekannt (NEUMANN 1928) und z. B. von KVITTINGEN (1955) bei Untersuchungen über Natur und Bedeutung der Bakteriengeißeln angeführt worden. Eine Wiederholung der Versuche erwies sich jedoch als notwendig, da die verwendeten Bakterienstämme und Kulturbedingungen nicht die gleichen und daher die Ausbildung und zeitliche Aufeinanderfolge der einzelnen Entwicklungsstadien verschieden waren.

3. Zellängen, Feulgenfärbung

Tab. 1 (S. 4) soll die wechselnde Länge der *Proteus*-Zellen im Verlauf des Entwicklungscyclus auf Agarplatten veranschaulichen.

Im Beimpfungsmittelpunkt beträgt die Bakterienlänge etwa 1,4 μ . Das Alter der Plattenkulturen (0—13 Stunden) hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Länge der Zellen im Beimpfungsmittelpunkt, die lediglich zwischen 6 und 8 Std Kulturalter etwas größer werden.

Zeitlich gesehen steigt die Bakterienlänge in der äußeren Schwärmzone mit wachsendem Abstand vom Beimpfungspunkt stark an. In der Schwärmzone selbst sind die Zellen besonders lang. Von ihrem Innenrand bis zur Plattenmitte hin ist zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung eine relativ geringe Abnahme der Zellängen zu beobachten. Die Ringbildung gegen Ende der Schwärmpériode ist ein optisches Phänomen, welches in erster Linie durch unterschiedliche Zelldichte der Zonen hervorgerufen wird. Sobald die äußere Schwärmzone die Peripherie der Agarplatte er-

Tabelle 1. *Proteus vulgaris*. Oberflächenkultur auf Agarplatten
Bakterienlängen in Abhängigkeit vom Kulturalter

Kulturalter in Stunden	Durchmesser der Kultur in mm	Abb.	Zone ¹	Ringbreite in mm	Zellänge in μ	$\sqrt{\frac{\Sigma v^2}{n(n-1)}}$	n =
(Beimpft)	—	—	(1)	—	1,4	$\pm 0,05$	41
2	—	—	(1)	—	1,5	$\pm 0,03$	40
4	6	—	1	2	3,6	$\pm 0,25$	20
			2	—	1,6	$\pm 0,06$	40
6	12	1	1	2,5	11,5	$\pm 1,01$	23
			2	2	1,8	$\pm 0,05$	40
			3	—	1,7	$\pm 0,04$	40
7	30	2	1	7	19,3	$\pm 1,17$	34
			2	6	4,0	$\pm 0,28$	48
			3	—	1,8	$\pm 0,05$	40
8,5	60	—	1	12	21,7	$\pm 1,24$	30
			2	1	5,6	$\pm 0,40$	37
			3	12	3,1	$\pm 0,18$	40
			4	—	1,7	$\pm 0,08$	40
10	80	—	1	10	22,6	$\pm 1,81$	27
			2	7	5,4	$\pm 0,46$	62
			3	7	6,0	$\pm 0,36$	36
			4	10	2,4	$\pm 0,11$	38
			5	4	1,6	$\pm 0,07$	42
			6	—	1,5	$\pm 0,05$	35
13	Platte über- schwärmt	—	—	—	1,4	$\pm 0,04$	47

¹ Von außen nach innen wurden alle erkennbaren Zonen numeriert, beginnend mit 1. Nr. 1 ist daher stets die Schwärmzone, die jeweils höchste Nummer die Impfzone.

reicht hat, setzt eine lebhaftete Zerteilung der Schwärmzellen ein, so daß 3 Std später wieder eine in sich homogene Kultur mit Zellen von etwa $1,4 \mu$ Länge vorliegt.

Feulgenfärbungen der einzelnen Entwicklungsstadien zeigen distinkte, feulgenpositive Bereiche in den Bakterien. Während Zellen aus der

Beimpfungszone nur ein oder zwei Nucleoide erkennen lassen, ist in Bakterien aus der Schwärmzone eine kettenförmige Anordnung der Nucleoide sichtbar (Abb. 3). Es kann sich bei diesen Strukturen nicht etwa um eine Osmiumsäureanlagerung handeln, die durch die Fixation hervorgerufen wird, denn fixierte aber ungefärbte Präparate zeigen keine Innenstrukturen (Abb. 4).

Lichtmikroskopisch stellt also der Schwärmer auf Grund der Feulgenfärbung einen Zellverband dar. Er besteht aus einer Reihe von perlschnurartig angeordneten Einheiten, die im Mittel einen Abstand von $1\ \mu$ von-



Abb. 3. Feulgenfärbung von *Proteus*-Zellen (Plattenkultur, Schwärmzone). Kettenförmige und teils paarweise Anordnung der Nucleoide. Vergr. 2800mal

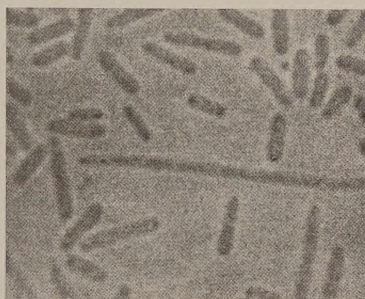


Abb. 4. *Proteus*-Zellen (Plattenkultur, Schwärmzone) nach 2 Std Fixation in 1% OsO_4 -Lösung. Im Innern der Zellen sind keine Strukturen sichtbar. Vergr. 2800mal

einander halten. Bemerkenswert erscheint dabei die Tatsache einer zum Teil paarweisen Anordnung der Nucleoide, auf die schon KNÖLL u. ZAPP (1954) hinwiesen.

Es zeigt sich also, daß man bei Längenmessungen der Bakterien in den einzelnen Entwicklungsbereichen zu sehr verschiedenen Ergebnissen gelangt. Bei der Ausbildung von Schwärmzellen muß zwar eine wiederholte Teilung feulgenpositiver Substanz eintreten, wofür auch die mitunter paarweise Anordnung der feulgenpositiven Bezirke spricht, eine Abschnürung einzelner Zellen unterbleibt jedoch. Welche Bedingungen dem zugrunde liegen, ist unbekannt. Das Problem der Schwärmerbildung in Abhängigkeit von der Konzentration des Nährsubstrates soll erst später wieder aufgegriffen werden.

4. Übermikroskopische Untersuchungen der Begeißelung

a) Methoden

Man kann mit einer Capillarpipette einen Tropfen aqua dest. auf den zu untersuchenden Plattenbereich bringen. Innerhalb kurzer Zeit tritt eine Bakterianreicherung in der Flüssigkeit ein. Ein Teil dieser Suspension wird sodann mit einer anderen Capillarpipette auf eine befilmte Netzblende gesprüht. Die Präparate werden an der Luft getrocknet.

Es lassen sich auch Abklatschpräparate mit befilmten Netzblenden herstellen. Sie zeigen eine anscheinend natürliche Geißelanordnung, eignen sich daher besonders zum Auszählen der Geißeln am Bakterium, sind jedoch durch anhaftendes Nährsubstrat stark verunreinigt.

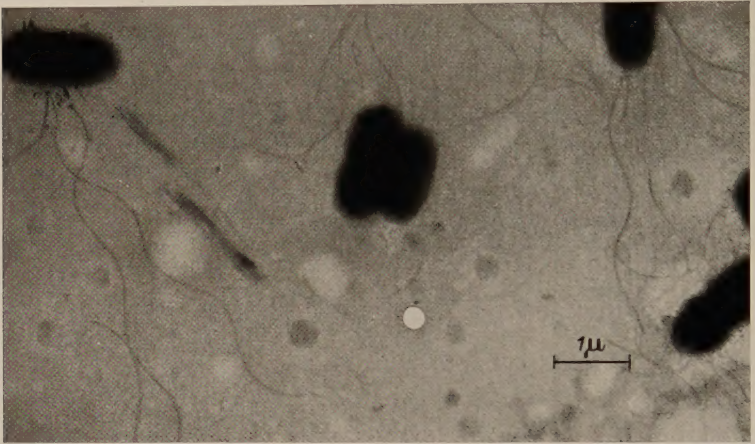


Abb. 5. *Proteus vulgaris*. Bakterien in aqua dest. suspendiert (Plattenkultur, Beimpfungszone, 7 Std). Schwache Begeißelung der Einzelzellen. Vergr. 9 800mal

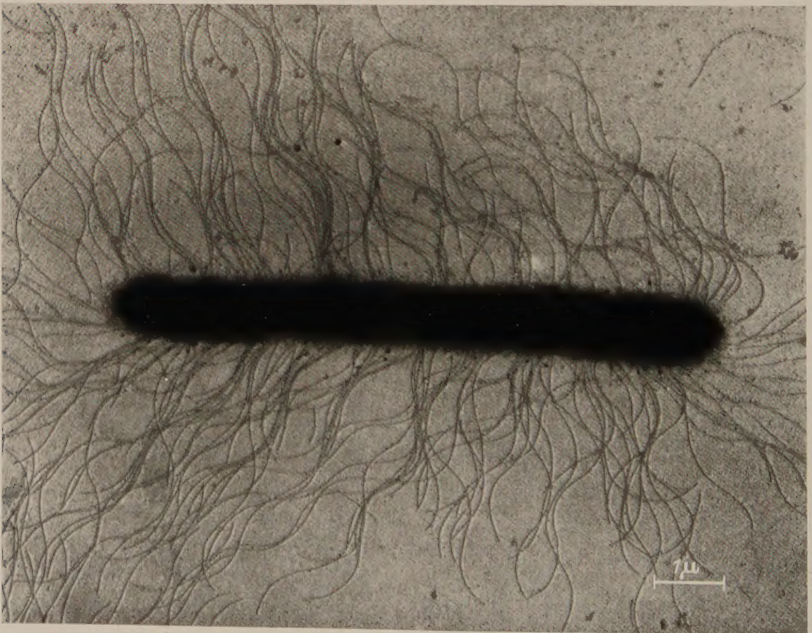


Abb. 6. *Proteus vulgaris*. Bakterien in aqua dest. suspendiert. (Plattenkultur, Innenrand der Schwärmzone 7 Std). Vergr. 9 000mal

Die Präparate wurden anschließend mit Au/Pd unter 15° im Hochvacuum bedampft und in einem Siemens-Üermikroskop (ÜM 21, Baujahr 1939) untersucht. Filmmaterial: Perutz-Kontrastplatten, Entwickler: Kodak D 8.

b) Geißelanzahl

Tab. 2 zeigt die Geißelanzahl je 1μ Bakterienlänge in den einzelnen Entwicklungsstadien. Aus den Abbildungen von kurzen Zellen, wie sie im Beimpfungsmittelpunkt und auf der überschwärmten Platte zu finden sind, geht hervor, daß hier nur wenige Geißeln (im Mittel 4) dem Bakterium anhaften (Abb. 5).

Tabelle 2. Geißelzahlen je Mikron Bakterienlänge in Abhängigkeit vom Kulturalter

Kulturalter in Stunden	Zone	Geißelzahlen/ μ	Mittelwert	$\sqrt{\frac{\Sigma v^2}{n(n-1)}}$
4 5 6 9 13	Beimpfungspunkt	(15); 6; 1; 2; 1; 1; 3; 2; (15); 4; 2; 2,4; 3; 2,8; 5; 3; 2,5;	2,7	$\pm 0,4$
5 5,5 6 7,5 8 8,5 9	Bereiche zwischen Beimpfungspunkt und Schwärmzone	12; 10; 15,2; 12; 5; 5; 10; 6,8; 10,9; 7,2; 5,5; 19; 19; 12; 12; 10; 13; 5,5; 5; 9,6; 13; 13,3; 16; 16; 19; 10;	11,2	$\pm 1,2$
5 7 7,5 8 8,5 9 10 11	Schwärmzone	15,5; 30,8; 26,6; 25,4; 26,2; 12; 12; 31,4; 26,6; 16; 25,5; 24; 28; 20; 22; 26; 28; 34; 22; 24; 30; 20; 22; 20;	23,7	$\pm 1,2$
13	Platte überschwärmt	1; 2; 3,7; 3,3; 2,3; 2; 2,7; 4,9;	2,7	$\pm 0,4$

Anders ist es dagegen weiter peripher in der Nähe der Schwärmzone. Die Bakterien, die an Länge zugenommen haben, besitzen hier schon eine bedeutend größere Anzahl von Geißeln (Abb. 6). In der Schwärmzone selbst wird die Begeißelung noch wesentlich stärker.

Ein Vergleich von Tab. 2 mit Tab. 1 (S. 4) zeigt, daß abgesehen vom Impfmittelpunkt überall, besonders aber im Schwärmbereich die Geißelzahl je 1μ Bakterienlänge größer ist, als es eine subpolare Begeißelung

jeder cytologischen Einheit, welche etwa $1\ \mu$ lang ist, erlauben würde. Je weiter peripher man untersucht, desto größer ist demnach der Grad der Peritrichie.

Die Geißelanzahl je $1\ \mu$ Bakterienlänge ist vom jeweiligen Entwicklungsstadium abhängig. Sie beträgt im Impfmittelpunkt im Rahmen der Meßgenauigkeit etwa 2—3 Geißeln je $1\ \mu$, in den von der Schwärmzone aus nach innen zu liegenden Kulturbereichen etwa 10—12 Geißeln je $1\ \mu$, in der Schwärmzone selbst dagegen etwa 24 Geißeln je $1\ \mu$ Bakterienlänge. Auffallend ist die starke Streuung der Meßwerte in den äußeren Kulturbereichen. Abb. 2 zeigt in diesen Zonen ein rhythmisches Wachstum (mehrfache Ringbildung). Wegen der geringen Breite der Ringe (oftmals nur 1 mm) war es bisher nicht möglich, Bakterien aus einzelnen Ringen getrennt zu präparieren. Man könnte die Streuung der Meßwerte damit erklären, daß die Geißelzahl je $1\ \mu$ Bakterienlänge über eine Periode hin örtlich verschieden ist.

Da der Abstand der Nucleoide voneinander überall im Mittel etwa $1\ \mu$ beträgt, so folgt, daß einer cytologischen Einheit eine im Verlauf des Wachstums veränderliche Anzahl von Geißeln zugeordnet werden kann.

c) Geißelstruktur

ASTBURY u. WEIBULL (1949) sowie BRAUN (1955) geben für den Durchmesser der *Proteus*-Geißel 120 AE an. An anderen beweglichen Bakterien werden von DE ROBERTIS u. FRANCHI (1951) sowie LABAW u. MOSLEY (1954) ebenfalls 120 bis 150 AE als Geißeldurchmesser nachgewiesen. STARR u. WILLIAMS (1952) beschreiben bei der Geißel eines diphtheroiden Bakteriums, die einen Durchmesser von 190 AE hat, eine linksgedrehte, dreifach gewundene Schraubenstruktur mit einer Periode von 500 AE.

Diesen Befunden stehen Messungen an *Coli*-Geißeln gegenüber, deren Durchmesser von BRAUN (1955) mit etwa 300 AE angegeben wird. Auch bei ihnen konnte der Autor eine schraubige Feinstruktur mit unterschiedlicher Ganghöhe und einem Periodenabstand von hier 640—660 AE beobachten.

Bei den Geißeln von *Proteus* sind bisher noch keine feineren Längselemente nachgewiesen worden. Wenn man bei allen bisherigen Untersuchungen die gleiche Meßgenauigkeit voraussetzt, ist der Geißeldurchmesser verschiedener Bakterien gewissen Schwankungen von Art zu Art unterworfen. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß die Feinstruktur der Geißeln in diesem Fall anders sein sollte als bei den oben erwähnten Bakterien. Bei Abbildungen mit hoher Auflösung zeigt sich in der Tat nach eigenen Untersuchungen, daß die *Proteus*-Geißel (Durchmesser 132 ± 6 AE bei $n = 20$) eine Periode ($= \frac{1}{2}$ Windung) von 260 AE besitzt (Abb. 7). Diese Feinstruktur kann nur darauf beruhen, daß die Geißel aus mehreren, miteinander verdrehten Einzelfibrillen besteht.

Die von verschiedenen Autoren (HOUWINK u. VAN ITERSOM 1950, SMITH 1954, BRAUN 1955) bei *Proteus* und anderen Bakterien beschriebenen „Pseudogeißeln“ wurden ebenfalls beobachtet (Abb. 8). Sie weisen

nur etwa die halbe Dicke echter Geißeln auf. Messungen ergeben einen Durchmesser von $74 \pm 4,3$ AE ($n = 10$). Da sich hier hinsichtlich Dicke und Länge dieser Strukturen niemals Übergänge zu echten Geißeln feststellen ließen, so ist, wie schon die oben erwähnten Autoren angaben,

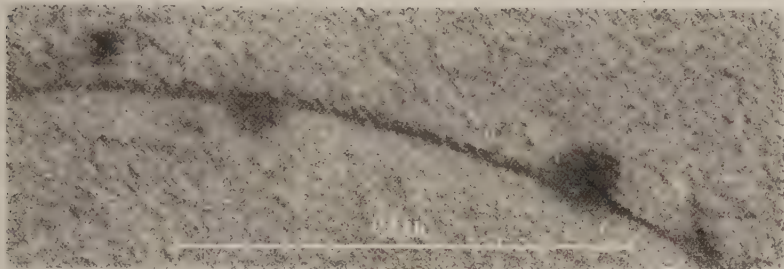


Abb. 7. *Proteus*-Geißel. Durchmesser 132 AE, Periode 260 AE. Vergr. 120000mal. Es handelt sich hierbei um eine der beiden auf Abb. 8 dargestellten Einzelgeißeln

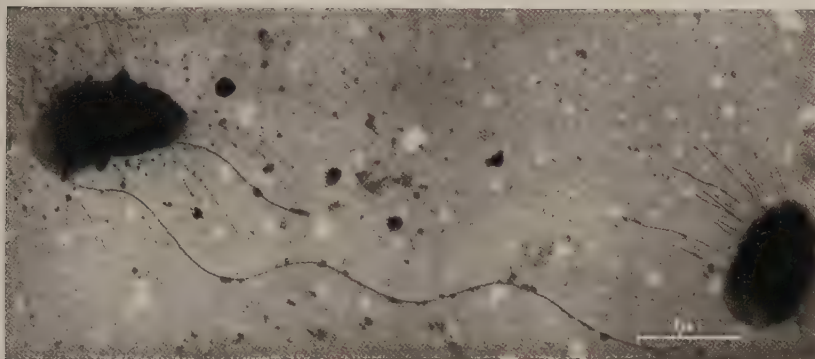


Abb. 8. *Proteus vulgaris* mit echten Geißeln und „Pseudogeißeln“. Vergr. 13700mal

wohl die Definition „junge Geißeln“ für diese Filamente unangebracht. Eher könnte es sich bei diesen Gebilden um getrockneten Bakterien-schleim handeln. In diesem Zusammenhang sei auf die Untersuchungen von MÜHLETHALER (1950) hingewiesen, der bei Pflanzenschleimen eine mikrofibrilläre Struktur beobachtete. Der Durchmesser einer Tragant-schleim-Fibrille beträgt z. B. 100 AE.

B. Untersuchungen an Flüssigkeitskulturen

1. Methodik

In erster Linie fanden Nährsubstrate Verwendung, die bereits für Plattenkulturen beschrieben wurden (S. 2), hier naturgemäß ohne Agarzusatz. Außerdem ließen sich die Bakterien in einer Lösung kultivieren, die 0,01% Pepton S, 0,006% Liebig's Fleischextrakt sowie 0,01% NaCl enthielt, also eine Nährlösung darstellt, in der die Salz- und Eiweißkonzentration gegenüber den im allgemeinen für Kultivierungszwecke üblichen Nährstoffmengen stark herabgesetzt ist.

10 cm³ Nährlösungsansätze in Reagensgläsern wurden mittels Platinöse aus 24 Std alten Vorkulturen gleicher Nährstoffzusammensetzung beimpft und bei 37° C kultiviert. Untersuchungen in vivo wurden mit dem Leitz-Ortholux-Mikroskop durchgeführt. Optik hier: Phasenkontrast Fluorit (Öl) 70/1,15, Periplan-Ocular 10×. Die Präparate für übermikroskopische Untersuchungen wurden in folgender Weise hergestellt:

a) Die Bakterien wurden vom Nährsubstrat durch 15 min langes Zentrifugieren bei 1500 U/min abgetrennt und in 1 cm³ aqua dest. suspendiert. Ein Mikrotropfen

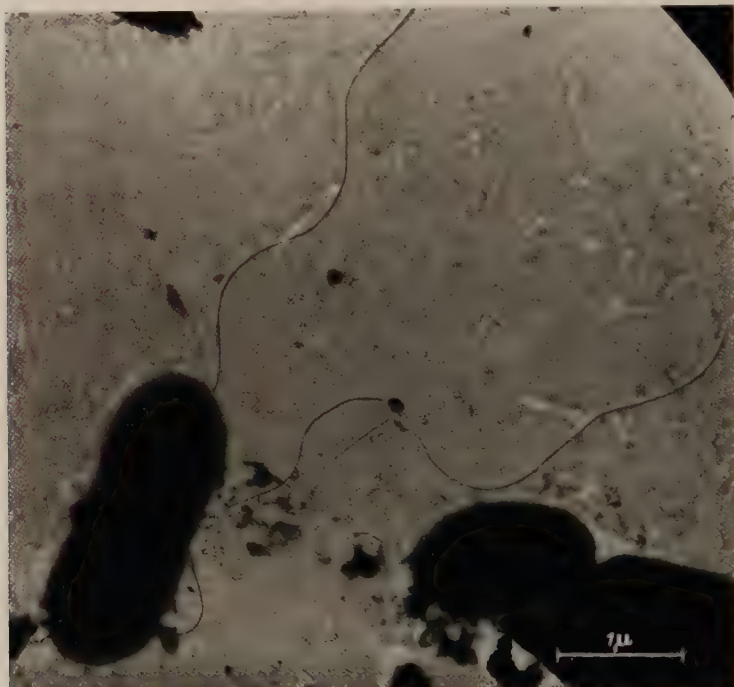


Abb. 9. *Proteus vulgaris* (peptonhaltige Flüssigkeitskultur, 17 Std bei 37° C). Vergr. 16300ma

davon, mit einer Capillarpipette auf die Blende aufgebracht, wurde an der Luft getrocknet und das Präparat unter 15° mit Au/Pd bedampft.

b) Die Bakterienpräparate aus dem Substrat mit stark herabgesetzter Salz- und Eiweißkonzentration gewinnt man durch direktes Antrocknen eines Mikrotropfens der Kultur auf der Blende. Dadurch ist eine Verunreinigung der Objekte mit anhaftenden Nährlösungsresten und Salzkristallen unvermeidbar. Man muß jedoch auf ein Abzentrifugieren der Nährlösung verzichten, um das Abreißen von Geißeln möglichst zu vermeiden. Die an der Luft getrockneten Präparate werden dann, wie oben beschrieben, bedampft.

2. Entwicklungscyclus, Zellängen, Begeißelung

Kurz nach dem Impfen und ebenso in einer ausgewachsenen Kultur finden sich etwa die gleichen Bakterienlängen, und zwar $1,8 \pm 0,2 \mu$ ($n = 40$). Auch hinsichtlich der Zahl ihrer Geißeln sind Bakterien aus

junger, bis zu 4 Std alten Kulturen mit Zellen aus der stationären Periode gleichzusetzen. In beiden Entwicklungsstadien sind in den meisten Fällen nur 2 Geißeln je Bakterium sichtbar (Abb. 9). Da durch das Zentrifugieren ein großer Prozentsatz der Geißeln abgerissen wird, erscheinen viele Zellen unbegeißelt.

Andere Befunde ergeben sich aus Bakterienuntersuchungen kurz vor Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Während die Länge der

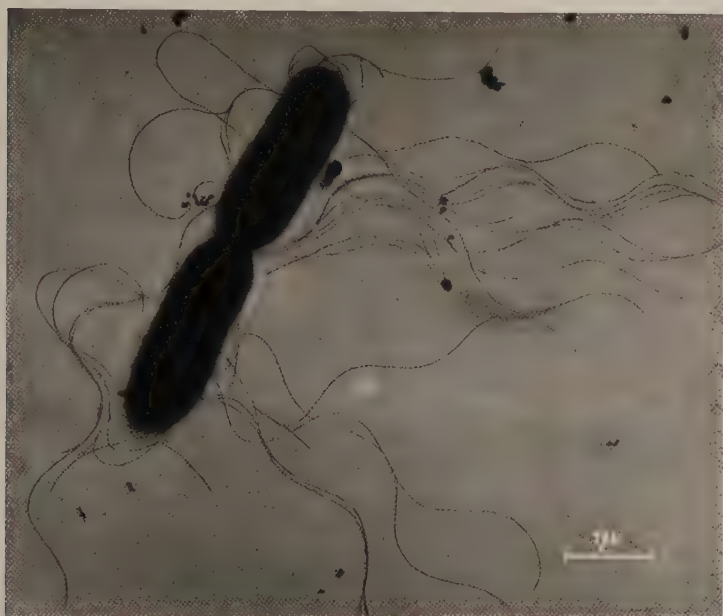


Abb. 10. *Proteus vulgaris* (peptonhaltige Flüssigkeitskultur, 4 Std bei 37°C). Vergr. 11200mal

Zellen im Mittel nur wenig zunimmt ($2,8 \pm 0,1 \mu$ bei $n = 20$), steigt die Geißelzahl je 1μ Bakterienlänge auf $6,8 \pm 1,1$ bei $n = 10$ (Abb. 10). Demnach ist hinsichtlich der Begeißelung in Flüssigkeitskulturen ein ähnlicher Entwicklungszyklus vorhanden, wie er für oberflächenkultivierte Bakterien beschrieben wurde; indessen erreicht die Geißelanzahl je 1μ Bakterienlänge in keinem Fall einen so hohen Wert wie bei Zellen aus Oberflächenkulturen.

Feulgenfärbungen liefern in allen Entwicklungsstadien bei Bakterien aus peptonhaltigen Kulturen eine lichtmikroskopisch „diffuse“ positive Reaktion des Bakterienplasmas. Sie wurde schon von PIETSCHMANN u. RIPPEL (1932) beschrieben. Die Gründe hierfür werden an anderer Stelle ausgeführt (PREUSSER, SCHLOTE u. RIPPEL-BALDES 1957, PREUSSER 1958).

Die Verteilung feulgenpositiver Bereiche in Bakterien aus synthetischem (asparaginhaltigem) Nährsubstrat kann nicht eindeutig bestimmt werden, da neben einer distinkten Anordnung am gleichen Präparat in einigen Zellen eine diffuse Verteilung sichtbar wird. Erst Bakterienschnitte können daher in diesem Fall zur Klärung der Nucleoidverhältnisse führen (PREUSSER 1958).

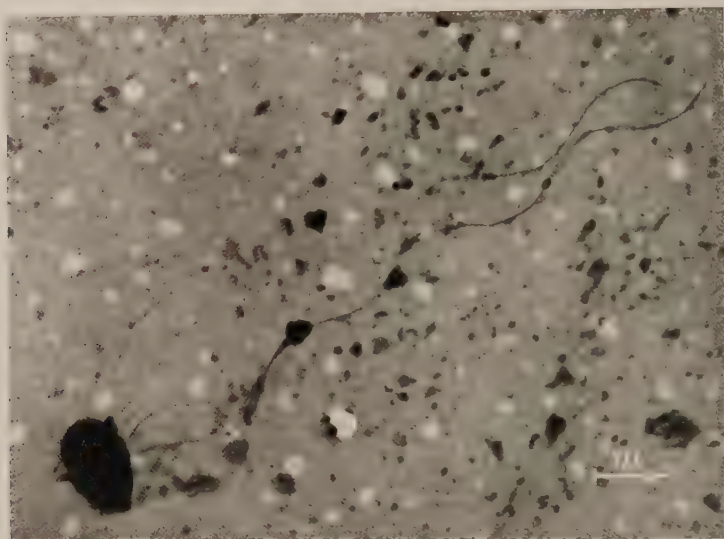


Abb. 11. *Proteus vulgaris* aus Flüssigkeitskultur mit stark herabgesetzter Salz- und Eiweißkonzentration. Nur kurze Zellen mit je 2 Geißeln, keine Schwärmerbildung! Vergr. 9 600 mal

Bakterien aus Flüssigkeitskulturen stark herabgesetzter Salz- und Eiweißkonzentration (0,01% Pepton, 0,01% NaCl, 0,006% Fleischextrakt) zeigen im elektronenmikroskopischen Bild eine Länge von etwa $1,2 \mu$ ($n = 25$), die unabhängig vom Alter der Kultur ist. In keinem Fall konnte hier die Ausbildung längerer Zellen beobachtet werden¹. Jedem Bakterium dürften im Normalfall 2 Geißeln zuzuordnen sein, was jedoch infolge Abreißen einzelner Geißeln im Verlauf der Präparation nicht immer sichtbar wird (Abb. 11).

C. Diskussion der Ergebnisse

Die von PIJPER (1947) durch Dunkelfeldbeobachtungen und Bewegungsstudien postulierten „Schleimgeißeln“ sind sicherlich nicht mit den hier beschriebenen Bewegungsorganellen identisch, die einen fibrillären

¹ Welche Bedingungen der Schwärmerbildung zugrunde liegen, ist noch nicht geklärt. Untersuchungen von HUGHES (1957) lassen zwar darauf schließen, daß eine, in ihrer Wirkung spezifische, flüchtige Substanz die Bildung von Schwärmerzellen auslöst, doch ist ihre chemische Natur noch unbekannt.

Feinbau erkennen lassen. Als getrockneten Bakterienschleim könnte man dagegen die von HOUWINK u. VAN ITERSOM (1950), SMITH (1954) sowie BRAUN (1955) beobachteten und auch auf eigenen Abbildungen sichtbaren „Pseudogeißeln“ bezeichnen, die etwa den halben Durchmesser echter Geißeln aufweisen und keinen Feinbau erkennen lassen. Diese Vermutung stützt sich auf die Befunde von MÜHLETHALER (1950), der bei übermikroskopischer Untersuchung von Pflanzenschleimen eine mikrofibrilläre Struktur feststellte.

NEUMANN (1928), PLJPER (1930) und PIETSCHMANN (1939, 1942) fügten den verwendeten Nährlösungen Gummiarabicum, Methylcellulose oder Tragant bei, was die Bakterienbewegung beträchtlich verlangsamt. Erst dadurch ist praktisch die Möglichkeit gegeben, Bakteriengeißeln bzw. Aggregate von Geißeln in vivo darzustellen, da, wie die Befunde von ASTBURY u. WEIBULL (1949), DE ROBERTIS u. FRANCHI (1951), LABAW u. MOSLEY (1954) sowie BRAUN (1955) zeigen und eigene Untersuchungen bestätigen, die Einzelgeißel einen Durchmesser von nur etwa 130 AE besitzt und damit, außer bei sehr starken Lichtquellen, unsichtbar bleiben sollte. Wenn an Einzelzellen im Dunkelfeld 2 Geißeln beobachtet wurden, so ist deshalb das Vorhandensein eines Geißelzopfes nicht ohne weiteres auszuschließen. Die hier vorliegenden Untersuchungen ergaben, daß — abhängig von den Wachstumsbedingungen — eine Reihe von Einzelzellen eine Begeißelung aufweisen kann, die über die von PIETSCHMANN geforderte Subpolarität hinausgeht. Der Typus einer echten subpolaren Begeißelung wird erst bei Bakterien sichtbar, die in stark verdünnter Nährlösung gezüchtet werden. Es ist bisher nicht untersucht, ob die unter solchen Bedingungen kultivierten Mikroorganismen im Dunkelfeld ihre beiden Geißeln erkennen lassen.

Es stellt sich also heraus, daß die Konzentration der Nährlösung von entscheidender Bedeutung für die Geißelausbildung bei *Proteus vulgaris* ist. Man kann wohl annehmen, daß die für vorliegende Untersuchungen verwendete Nährstoffquelle (S. 9) eine Konzentration besitzt, die sich von allen übrigen benutzten Nährsubstraten am ehesten mit den Nährstoffverhältnissen im Boden, dem natürlichen Standort von *Proteus*, vergleichen läßt. Eine subpolare Begeißelung wäre demnach der „normale“ Zustand. Durch Erhöhung der Nährstoffkonzentration ist jedoch eine starke Vermehrung bei gleichzeitig gehemmter Zellteilung und Auftreten einer peritrichen Begeißelung herbeizuführen.

Welche Faktoren im einzelnen für die Ausbildung von peritricher Begeißelung verantwortlich sind, ist noch unbekannt. Untersuchungen der Begeißelung bei unterschiedlichem Stickstoffgehalt des Nährsubstrates könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Im Verlauf der Schwärmperiode nimmt bei *Proteus* auf Agarplatten die Geißelzahl je 1 μ Bakterienlänge vom Beimpfungspunkt zum äußeren

Schwärbereich hin zu; dies kommt in Tab. 2 zum Ausdruck. Da derartige Schwärmzellen scharf begrenzte feulgenpositive Bereiche, sogenannte Nucleoide, enthalten, deren Abstand voneinander etwa 1μ beträgt, so besitzt eine „cytologische Einheit“ sehr verschieden viele Geißeln, je nachdem, in welcher Zone des Schwärbereichs sich die Zelle gerade befindet.

Die Geißeln sind jedoch nicht büschelweise am Bakterienkörper inseriert, was man erwarten sollte, wenn es sich um entflochtene, ursprünglich dickere Einzelgeißeln handeln würde, sondern sie sind über die ganze Länge einer Zelle gleichmäßig verteilt. Nur gelegentlich kommt es vor, daß mehrere Geißeln in einer Art von Bündel einander parallel aufgetrocknet sind (Abb. 6). Hieraus muß man folgern, daß es sich bei den dargestellten Fibrillen tatsächlich um eine große Zahl von einzelnen Geißeln handelt, die — berücksichtigt man die Dunkelfeldabbildungen vieler Autoren — in Gruppen synchron zu schlagen vermögen. Man wird mit PIEKARSKI u. RUSKA (1939) sowie HOUWINK u. VAN ITERSON (1950) sagen können, daß es bei *Proteus* einen peritrichen Geißelansatz gibt. Allerdings ist diese Eigenschaft von *Proteus* und verschiedenen anderen Bakterien nach den oben gemachten Ausführungen nicht ohne weiteres als Klassifikationsmerkmal zu betrachten.

Die Existenz eines Basalkornes als Insertionspunkt der Bakteriengeißel ist sehr umstritten. Zwar wurde von verschiedenen Autoren (vgl. SCHUSSNIG 1953) ein solcher Körper bei beweglichen Bakterien angenommen und von HOUWINK u. VAN ITERSON (1950) sowie ZIEGLER (1956) an übermikroskopischen Totalpräparaten von *Pr. vulgaris* bzw. *Bact. radiculicola* dargestellt, doch handelt es sich in beiden Fällen um Aufnahmen mehr oder weniger autolyserter Zellen, in denen bei HOUWINK u. VAN ITERSON zahlreiche Wölbungen der Zellmembran abgebildet werden; bei ZIEGLER befindet sich am Ansatzpunkt der Geißel ein elektronendichter Körper, der als Basalkorn angesprochen wird. Diese Befunde können jedoch ebenso gut auf plasmatische Reste in den unvollständig autolyserierten Zellen zurückzuführen sein, wodurch der Eindruck eines Basalkornes entsteht. Übermikroskopische Untersuchungen zahlreicher Dünnschnitte durch Zellverbände mit starker Begeißelung zeigten in keinem Fall ein Basalkorn. Auch Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure, durch welche die Geißeln im Schnitt sichtbar gemacht werden können, ließen niemals Anhaltspunkte für die Existenz von Basalkörnern bei Bakterien erkennen (PREUSSER 1958).

Möglich wäre, daß Basalkorn und umgebendes Plasma die gleiche Elektronendichte besitzen und daher eine Abbildung in Schnittpräparaten nicht erwartet werden kann. Diese Annahme muß auf Grund der — wenigstens bei höheren Organismen — unterschiedlichen Zusammensetzung von Plasma und Basalkorn als unwahrscheinlich gelten.

Zu bemerken wäre ferner, daß der Ausdruck „Basalkorn“ für den Basalapparat von Protozoengeißeln und Cilien geprägt wurde. Diese Gebilde sind aber Derivate des Centriols, das einen bei allen Organismen etwa gleichen Durchmesser von 1200 AE besitzt (DE HARVEN u. BERNHARD 1956). Die aus ihm hervorgehende Geißel besteht — wo immer sie bei Protozoen und Metazoen untersucht wurde — aus 2 zentral und 9 peripher angeordneten Doppelfibrillen, welche einen Durchmesser zwischen 230 und 330 AE besitzen. Die Geißel (Außendurchmesser etwa 2500 AE) wird von einer 70 AE dicken Doppelmembran umgeben (RHODIN u. DALHAMN 1956).

Bei den Bakterien liegt dagegen ein völlig anderer Geißeltypus vor, so daß hier die Existenz eines Basalkornes in Analogie zu dem Basalapparat höherer Organismen recht fragwürdig erscheint.

Zusammenfassung

1. Der Entwicklungszyklus von *Proteus vulgaris*, Stamm 556, auf Agarplatten wird makroskopisch, licht- und übermikroskopisch untersucht.

a) Vom Beimpfungsmittelpunkt aus schwärmen die Bakterien über die Agarplatte, die sie nach etwa 13 Std als dünner Schleier überziehen.

b) Die Zellängen nehmen, zeitlich gesehen, im Schwärmbereich mit wachsendem Abstand vom Beimpfungspunkt zu. Daneben ist zu jedem Zeitpunkt der Untersuchungen eine Längenzunahme der Bakterien von innen nach außen sichtbar. Im Beimpfungsmittelpunkt bleibt die Bakterienlänge während des Entwicklungszyklus annähernd konstant. Nach Beendigung der Schwärmpériode zerteilen sich die Schwärmer in kurze Einzelzellen.

c) Feulgenfärbungen liefern in allen Entwicklungsstadien in den Zellen Nucleoide in jeweiligem Abstand von etwa $1\ \mu$. Schwärmzellen besitzen zahlreiche Nucleoide, bestehen also aus vielen cytologischen Einheiten.

d) Die Geißelzahl je $1\ \mu$ Bakterienlänge steigt von innen nach außen und bleibt innerhalb einzelner Schwärmbereiche über einige Stunden hin nahezu konstant. In der Schwärmzone sind die Zellen ausgesprochen peritrich begeißelt. Eine gewisse Bündelung benachbarter Geißeln im Abstand der cytologischen Einheiten voneinander ist erkennbar. Dies könnte von ursprünglich synchroner Bewegung herrühren. Die durch Zerteilung der Schwärmer entstehenden kurzen Zellen besitzen die gleiche Geißelanzahl je Mikron Bakterienlänge wie die Bakterien aus dem Beimpfungspunkt.

e) Einer cytologischen Einheit kann im Verlauf des Schwärmens der Zellen eine veränderliche Anzahl Geißeln zugeordnet werden.

2. Der Durchmesser der *Proteus*-Geißel beträgt 132 ± 6 AE. Die Geißel besteht aus mehreren miteinander verdrehten Einzelfibrillen. Daneben

treten „Pseudogeißeln“ mit einem Durchmesser von $74 \pm 4,3$ AE auf, deren Entstehung diskutiert wird.

3. Untersuchungen von Zellen aus Flüssigkeitskulturen zeigen folgendes:

a) Während sich die Bakterienlänge im Verlauf des Wachstums nur wenig ändert, kann hinsichtlich der Begeißelung ein ähnlicher Entwicklungszycelus wie bei plattenkultivierten Bakterien beobachtet werden.

b) In Substraten mit stark herabgesetzter Salz- und Eiweißkonzentration besitzt jede Zelle 2 Geißeln. Unter diesen Kulturbedingungen werden keine Schwärmzellen ausgebildet.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES danke ich für das rege Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. FR. W. SCHLOTE, Assistent im Zoologischen Institut der Universität Göttingen, der mich mit den Untersuchungsmethoden der Elektronenmikroskopie vertraut machte.

Die Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität Göttingen angefertigt, dem ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an dieser Stelle danken möchte.

Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und mit Unterstützung der Göttinger Akademie der Wissenschaften.

Literatur

- ASTBURY, W. T., and C. WEIBULL: *Nature* (Lond.) **163**, 280 (1949).
 BELOSERSKI, A. N.: *Mikrobiologija* **8**, 504 (1939). — BIRCH-ANDERSEN, A., O. MAALØE and F. S. SJÖSTRAND: *Biochim. et Biophysica Acta* **12**, 395 (1953). — BRAUN, H.: *Naturwissenschaften* **42**, 444 (1955).
 DE HARVEN, E., u. W. BERNHARD: *Z. Zellforsch.* **45**, 378 (1956). — DE ROBERTIS, E., and C. M. FRANCHI: *Exper. Cell. Res.* **2**, 295 (1951).
 HOUWINK, A. L., and W. VAN IJZERSON: *Biochim. et Biophysica Acta* **5**, 10 (1950). — HUGHES, W. H.: *J. gen. Microbiol.* **17**, 49 (1957).
 KNÖLL, H., u. K. ZAPF: *Zbl. Bakter., I. Orig.* **161**, 241 (1954). — KVITTINGEN, J.: *Acta path. scand. (Copenh.)* **37**, 89 (1955).
 LABAW, L. W., and V. M. MOSLEY: *Biochim. et Biophysica Acta* **15**, 325 (1954).
 MÜHLETHALER, K.: *Exper. Cell. Res.* **1**, 34 (1950).
 NEUMANN, F.: *Zbl. Bakter., I. Orig.* **96**, 250 (1925); **109**, 143 (1928).
 PIEKARSKI, G., u. H. RUSKA: *Klin. Wschr.* **1939**, 383. — *Arch. Mikrobiol.* **10**, 302 (1939). — PIETSCHEMANN, K.: *Arch. Mikrobiol.* **10**, 133 (1939); **12**, 377 (1942). — PIETSCHEMANN, K., u. A. RIPPEL: *Arch. Mikrobiol.* **3**, 422 (1932). — PIJPER, A.: *Zbl. Bakter., I. Orig.* **118**, 113 (1930). — *J. of Path.* **47**, 1 (1938); **58**, 325 (1946). — *J. Bacter.* **53**, 257 (1947). — PREUSSER, H. J., F. W. SCHLOTE u. A. RIPPEL-BALDES: *Naturwissenschaften* **44**, 186 (1957). — PREUSSER, H. J.: *Arch. Mikrobiol.* **29**, 17 (1958).
 REICHERT, K.: *Zbl. Bakter., I. Orig.* **51**, 14 (1909). — RIPPEL-BALDES, A.: *Grundriß d. Mikrobiol., I. Aufl.*, S. 25. Berlin-Göttingen 1947; *Grundriß d. Mikrobiol., 3. Aufl.*, S. 26. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — RHODIN, J., and T. DALHAMN: *Z. Zellforsch.* **44**, 345 (1956).
 SCHUSSNIG, B.: *Handb. d. Protophytenkd.* **1**. Jena 1953. — SMITH, I. W.: *Biochim. et Biophysica Acta* **15**, 20 (1954). — STARR, M. P., and R. C. WILLIAMS: *J. Bacter.* **63**, 701 (1952).
 ZIEGLER, H.: *Planta* (Berl.) **48**, 266 (1956).

(Aus dem Mikrobiologischen und dem Zoologischen Institut
der Universität Göttingen)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Cytologie von *Proteus vulgaris**

Von

H.-J. PREUSSER

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. September 1957)

Es ist bekannt, daß Bakterien in ihrem Innern Strukturen besitzen, deren chemische Substanz sich zum Teil mit der echter Zellkerne höherer Organismen vergleichen läßt; sie enthalten feulgenpositive Stoffe, DNS. Über die Verteilung dieser Substanz im Bakterienkörper liegen unterschiedliche Befunde vor. Während z. B. PIETSCHMANN u. RIPPEL (1932) an verschiedenen sporen- und nichtsporenbildenden Mikroorganismen lichtmikroskopisch eine gleichmäßig „diffuse“ positive Feulgen-Reaktion beschrieben, konnten STILLE (1937) und PIEKARSKI (1937, 1940, 1949) in allen von ihnen untersuchten Bakterien thymonucleinsäurehaltige, distinkte Bezirke nachweisen, die Nucleoide genannt wurden. Eine Zusammenfassung der bisherigen lichtmikroskopischen Befunde erschien von ROBINOW (1956).

Da ein Nucleoid vom anderen durch Plasma deutlich getrennt ist und es Zellen gibt, die nur ein Nucleoid besitzen, liegt der Schluß nahe, in Analogie zu den Befunden an höheren Organismen den Begriff „Einzelzelle“ oder besser „cytologische Einheit“ mit dem Begriff „Nucleoid“ zu verbinden. Bei einem Bakterium, welches mehrere Nucleoide enthält, ist also mit ebensovielen cytologischen Einheiten zu rechnen; eine Folgerung, die heute allgemein gezogen wird (BRAUN 1953).

Während der oben erwähnten, lichtmikroskopisch „diffusen“ Feulgen-Reaktion elektronenmikroskopisch eine gleichmäßige Verteilung elektronendichter Fäden im Bakterienplasma entspricht (PREUSSER, SCHLOTE u. RIPPEL-BALDES 1957), werden bei lichtmikroskopisch distinkter Feulgen-Reaktion in elektronenmikroskopischen Vergleichspräparaten „Kernvacuolen“ mit elektronendichter Substanz im Innern beobachtet (KELLENBERGER u. RYTER 1955, TOMLIN u. MAY 1955, PIEKARSKI u.

* Teilergebnisse aus der Dissertation „Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie und Cytologie von *Proteus vulgaris*“ der Mathem.-Naturwiss. Fakultät der Universität Göttingen 1957.

GIESBRECHT 1956 u. a.). Wenn solche „Kernvacuolen“ auch in lebenden Bakterien vorhanden sind und keine Präparationsartefakte darstellen, müßten die in Schwärmzellen von *Proteus vulgaris* nachgewiesenen, distinkten feulgenpositiven Bereiche (jeweiliger Abstand voneinander im Mittel 1μ , PREUSSER 1958) auch elektronenmikroskopisch in Dünnschnitten als „Kernvacuolen“ in etwa gleichem Abstand aufzufinden sein.

Fernerhin war zu prüfen, welche Faktoren für eine einerseits „diffuse“ Verteilung feulgenpositiver Substanz und andererseits für das Auftreten distinkter „Kernvacuolen“ in Bakterien des gleichen Stammes verantwortlich sind. Bei einem Durchmesser von nur etwa $0,5\mu$ der *Proteus*-Zellen ergeben sich wegen des zu geringen Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes methodische Schwierigkeiten. Es ist daher besser, diese Fragen durch übermikroskopische Untersuchungen zu klären.

A. Schnitte durch oberflächenkultivierte Bakterien

1. Präparation

a) Schnitte durch Bakterien aus definierten Wachstumszonen

BASSERMANN (1955/56) fixierte Stücke aus einer Oberflächenkultur von Tuberkelbakterien bei $+2^{\circ}\text{C}$ in OsO_4 -Lösung oder in einem Osmium-Chrom-Essigsäure-Gemisch nach FLEMMING. NIKLOWITZ u. DREWS (1955) schwemmten die Bakterien mit dem Fixierungsmittel von der Agaroberfläche ab. In Modifikation dieser zwei Fixationsmethoden wurde hier, um die Bakterien definierten Stellen der Plattenkultur zuordnen zu können, folgendes Verfahren verwendet:

Aus dem Agar mit dem zu untersuchenden Entwicklungsstadium wurden kleine Blöckchen mit einer Grundfläche von etwa 4 mm^2 ausgeschnitten. Fixation: α) 80 min in einer 1%igen, isotonischen OsO_4 -Lösung, gepuffert mit einem von BIRCH-ANDERSEN, MAALÖE u. SJÖSTRAND (1953) angegebenen Salzgemisch auf pH 7,2 bei $+2^{\circ}\text{C}$, β) 80 min mit OsO_4 -Dämpfen in einer feuchten Kammer über 1%iger OsO_4 -Lösung bei $+2^{\circ}\text{C}$. Die nach den Verfahren α) und β) fixierten Bakterien zeigen gleiche Innenstrukturen, doch tritt nach Dampf fixation ein Ablösen der Zellmembran vom Bakterienplasma auf (Abb. 1). Die Ursache hierfür ist wohl in den veränderten osmotischen Verhältnissen zu suchen.

Die fixierten Bakterien wurden bei den nach α) fixierten Zellen nach Waschen in isotonischem Phosphatpuffer (Zusammensetzung BIRCH-ANDERSEN, MAALÖE u. SJÖSTRAND 1953) 12 Std in 70%, 1 Std in 90% und $1\frac{1}{2}$ Std in 100% Alkohol dehydriert. Einbettungsmaterial: Methacrylsäure-n-butylester und -methylester (Fluka AG Buchs/Schweiz) im Verhältnis 19:1, dazu 0,5% Benzoylsuperoxyd (Kebo/Stockholm). Darauf folgen: 1 Teil 100% Alkohol + 1 Teil Einbettungsmittel (1 Std), sodann reines, unvorpolymerisiertes Einbettungsmittel (2 Std). Eingebettet wurde schließlich mit der vorpolymerisierten Substanz in Gelatine-kapseln. Die Bakterien-schicht auf dem Agarwürfel muß dabei senkrecht zur Kapselgrundfläche stehen. Nach 15 Std bei 80°C polymerisierte der Kapselinhalt aus. Da man mit dem verwendeten Ultramikrotom nur Flächen bis zu $5 \times 5\mu$ schneiden kann, muß das Einbettungsmittel in Form einer Pyramide (Maximalhöhe 0,5 mm, Winkel zur Grundfläche 45°) zugespitzt werden, in deren Spitze die Bakterien-schicht liegt.

Ultradünnschnitte wurden nach dem Standardverfahren mit Metall- oder Glas-messern auf einem SJÖSTRAND-Mikrotom hergestellt.

b) Längsschnitte durch Bakterien des Schwärmstadiums

Die beschriebene Art der Präparation kann nur für die Herstellung von Bakterienschnitten aus dem Beimpfungsmittelpunkt sowie von der völlig überwachsenen Agarplatte verwendet werden, also aus jenen Entwicklungsstadien, in denen nur mehr oder weniger kurze Organismen in größerer Anzahl auf dem Nährboden vorliegen (PREUSSER 1958). Für Versuche, Schnitte durch Schwärmzellen zu erhalten, ist diese Methode ungeeignet. Bei der geringen Bakteriendichte in der Schwärmzone — die Zellen liegen hier nebeneinander, bilden also ein nur etwa $0,5\ \mu$ dickes Lager — wird die Mehrzahl der Zellen durch das Fixationsmittel abgeschwemmt. Dies läßt sich zwar durch Dampffixation beheben, doch sind die wenigen auf dem Schnitt vorhandenen Organismen in jeder Richtung orientiert, so daß Längsschnitte durch Schwärmzellen nur äußerst selten erhalten werden.

Das von GAY (1955) für Chromosomenlängsschnitte angegebene Verfahren wurde daher zu einer Methode modifiziert, die Längsschnitte durch die dünne Schwärmzone zu legen gestattet: Ein Deckglas-Abklatschpräparat mit Schwärmzellen wird in üblicher Weise in OsO_4 -Dampf fixiert, dehydriert und eine mit vorpolymerisiertem Einbettungsmaterial gefüllte Gelatine kapsel aufgesetzt. Nach Polymerisation des Einbettmittels (15 Std bei 80°C) wird das Deckglas von der Kapsel abgelöst. Die dünne Bakterienschicht liegt nun in einer Ebene unmittelbar an der Oberfläche des Kapselblockes. Auf diese Weise gelingt es, praktisch alle Bakterien des Ausstriches längs zu schneiden.

2. Innenstrukturen

a) Impfmittelpunkt

Zellen ganz verschiedenen Alters aus dem Beimpfungspunkt zeigen elektronenmikroskopisch das gleiche Bild: Feingranuliertes Plasma schließt im Innern der Zelle einen Bereich ein, der in seiner Elektronendichte dem Einbettungsmaterial außerhalb der Zelle ähnlich ist. Von PIĘKARSKI u. GIESBRECHT (1956) wird diese Zone „Kernvacuole“ genannt. In ihrem Innern befindet sich elektronendichtes Material, das in einzelnen Fällen fadenförmige Strukturen erkennen läßt (Abb. 1); Fadendurchmesser etwa $150\ \text{\AA}$.

Die Zusammenballung der Fäden im Innern der „Kernvacuole“ kann soweit fortschreiten, daß ein kompakter Körper entsteht. Dort, wo ein solches Gebilde wie auseinandergezogen erscheint, dürfte es sich um den Beginn einer Teilung handeln.

Zu gleichen Ergebnissen führen Untersuchungen durch Zellen aus dem Stadium der völlig überwachsenen Agarplatte.

b) Schwärmzone

In Schwärmzellen dagegen liegen, wie sich schon bei der lichtmikroskopischen Feulgen-Färbung herausstellte (PREUSSER 1958) eine größere Anzahl von Nucleoiden hintereinander. Sie halten einen mittleren Abstand von etwa $1\ \mu$. Elektronenmikroskopisch findet man nun bei Längsschnitten durch Schwärmer jene Bereiche geringer Elektronendichte im

Abstand von $0,94 \pm 0,02 \mu^1$ ($n = 20$); einen Wert, der unter Berücksichtigung der Schrumpfung beim Einbetten und Mikroskopieren (10 bis 20%) in derselben Größenordnung liegt. Diese Bereiche enthalten ebenfalls jene schon beschriebenen dunklen Fäden (Abb. 2). Auch hier sind diese Fadenstrukturen mehr oder weniger stark zusammengeballt, doch erkennt man, daß die Durchmesser der Fäden verschieden groß sein



Abb. 1. *Proteus*-Zellen aus Plattenkultur (Beimpfungsmittelpunkt, 11 Std). „Kernvacuolen“ mit Zusammenballungen von Fäden im Innern. Einzelfäden zum Teil sichtbar, Fadenstärke etwa 150 Å. Vergr. 55 000mal

können. In Abb. 2a werden als Fadendicken 180 Å und 360 Å gemessen. Über die Zahl der Fäden je „Kernvacuole“ kann noch nichts ausgesagt werden.

3. Lokalisation der DNS

Nach Versuchen von KNÖLL u. ZAPF (1954) können die DNS-haltigen Zellbestandteile auf Grund lichtmikroskopischer Vergleiche den übermikroskopischen Hellzonen zugeordnet werden. Zu gleichen Ergebnissen führen fernerhin auch Beobachtungen an Bakterienschnitten von KELLENBERGER u. RYTER (1955), TOMLIN u. MAY (1955), PIEKARSKI u. GIESBRECHT (1956), BASSERMANN (1955/56, 1956) sowie BIRCH-ANDERSEN, MAALØE u. SJÖSTRAND (1953). Ob nun die Bereiche geringer Elektronendichte selbst oder die in ihnen angeordneten Fäden die positive Feulgen-Reaktion hervorrufen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

¹ Die Streuung aller in dieser Arbeit angegebenen Werte wird durch den einfachen mittleren Fehler des Mittelwertes ausgedrückt.

Es ist bekannt, daß der Elektronenkontrast zwar durch Einlagerung von Osmium in die Elemente der Zelle begünstigt wird, jedoch die Massendichte der zelleigenen Substanzen selbst ebenfalls einen wesentlichen Beitrag zum Elektronenkontrast leistet (ZEITLER u. BAHR 1957, ORNSTEIN 1957). Dafür sprechen auch die Befunde von MAALØE, BIRCH-ANDERSEN

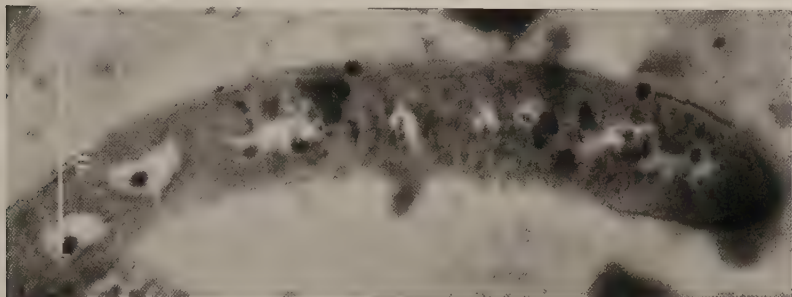


Abb. 2. Längsschnitt durch Schwärmzellen von *Proteus* (Plattenkultur). „Kernvacuolen“ mit mehr oder weniger zusammengeballten Fäden im Innern. Vergr. 25 700 mal

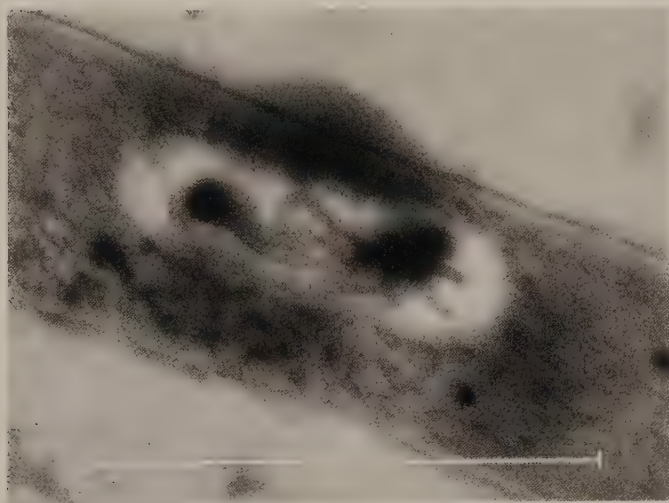


Abb. 2 a. Vermutlich beginnende Nucleoidteilung: Einfach- und Doppelfäden in derselben „Kernvacuole“. Fadenstärken: Etwa 180 Å (Einfachfaden) und 360 Å (Doppelfaden). Vergr. 76 000 mal

u. SJÖSTRAND (1954) an formolfixierten Bakterien. Diese Autoren kamen zu dem Schluß, daß die DNS in jenen Fäden zu suchen sei, die das Innere der „Kernvacuole“ erfüllen. Dem stehen jedoch die Ergebnisse von BAHR (1954) gegenüber, der eine besondere Reaktionsträgheit der DNS gegen OsO_4 fand; durch Proteine (besonders tryptophan- und histidinhaltige) dagegen wurde OsO_4 schnell reduziert.

Vielleicht lassen sich beide Ansichten vereinen: Dort, wo in den hier vorliegenden Untersuchungen jene fädigen Strukturen im Anschnitt getroffen wurden, scheinen sie aus einer elektronendichten Hülle und einem hellen Innenraum zu bestehen. Demnach könnte es sich um DNS-Stränge handeln, welche von einer Proteinhülle umgeben werden.

Damit würden sich die Deutung von MAALØE, BIRCH-ANDERSEN u. SJÖSTRAND (1954) einerseits und die Befunde von BAHR (1954) andererseits nicht widersprechen. Für eine solche Interpretation spricht fernerhin die Tatsache, daß RIS (1956) in Schnitten durch Antheren von *Lilium longiflorum* bei Metaphasestadien der Mikrosporenmutterzelle ähnliche Fadenstrukturen fand, die bei diesem Objekt einen Außendurchmesser von etwa 200 Å mit einer hellen „Seele“ von 80 Å zeigen. Es ist denkbar, daß die in Bakterien gefundenen Fadenstrukturen mit jenen aus Kernen höherer Organismen vergleichbar sind.

Diesen Anschauungen stehen die Ansichten von ROBINOW (1953) u. MURRAY (1953) gegenüber, die an Schnitten durch *Bac. cereus* die hellen Bereiche der „Kernvacuole“ als Sitz DNS-haltiger Strukturen ansehen.

4. Kontrastierungsversuche für DNS

Nun gibt es leider bisher keinen spezifischen „Elektronenfarbstoff“ für DNS. Lediglich den Lanthansalzen wird eine gewisse Affinität zu diesen Nucleinsäuren nachgesagt. So weisen PIEKARSKI u. RUSKA (1939) auf ein von CASPERSSON u. HAMMARSTEN (1935) angegebenes Verfahren hin, das möglicherweise zu einer Klärung der Kernfrage bei den Bakterien führen könnte. Es beruht darauf, daß durch eine Enzympräparation (Trypsin) die Eiweißkörper gespalten und die freiwerdenden Nucleinsäuren anschließend als unlösliche Lanthansalze gefällt werden. Schon seinerzeit wurde jedoch von CASPERSSON (1936) betont, daß die an Modellversuchen gewonnenen Ergebnisse zwar in der Regel leicht auf lebende Zellen zu übertragen seien, jedoch nur dann, wenn es sich nicht um besonders feine Strukturen handele.

Da derartige Methoden für übermikroskopische Untersuchungen zu rauh sind, wurde in Anlehnung an die in der Elektronenmikroskopie üblichen Verfahren, bereits fixierte Zellen mit Schwermetallsalzen zu kontrastieren, ein Versuch mit Lanthannitrat durchgeführt.

a) Lanthannitrat

Methode: Deckglas-Abklatschpräparate aus der Schwärmzone wurden im Anschluß an Dampf fixation 1 Std in 1% iger Lösung von $\text{La}(\text{NO}_3)_3 + 6 \text{H}_2\text{O}$ (gelöst in aqua dest.) belassen.

Beim Vergleich mit unbehandelten Zellen fällt auf, daß die „Kernvacuole“ von zahlreichen, äußerst dünnen, elektronendichten Fäden regellos durchzogen wird (Abb. 3). Der Fadendurchmesser beträgt etwa

80 Å. Die erhaltenen Strukturen sind bisher unverständlich. Die erwartete Kontraststeigerung bleibt völlig aus, und der Inhalt der Hellzone zeigt gegenüber unbehandelten Präparaten einen vollkommen veränderten Aufbau: Es scheint, als ob sich die mit Osmiumfixierung darstellbaren Fäden durch Lanthannitrat in dünnere Einheiten aufgelöst hätten¹.

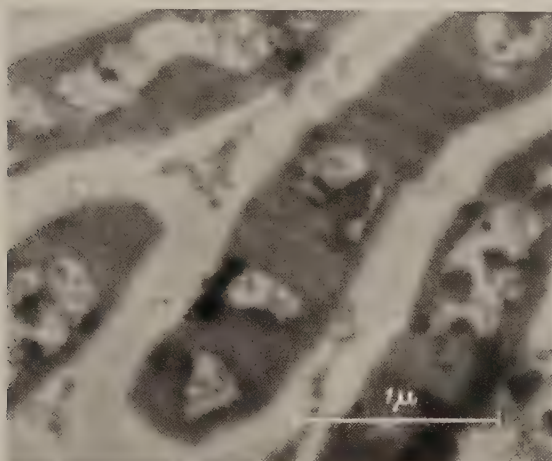


Abb. 3. Längsschnitt durch Schwärmzellen von *Proteus* (Plattenkultur, Kontrastierung mit Lanthannitrat). Vergr. 26 500 mal

b) Phosphorwolframsäure

Ein anderes Kontrastierungsmittel für elektronenmikroskopische Untersuchungen ist Phosphorwolframsäure. RINKER u. KOFFLER (1949, 1951) verwendeten sie als Indicator basischer Gruppen, um Bakteriengeißeln in übermikroskopischen Totalpräparaten sichtbar zu machen.

Methode: Statt in dem für die Dehydrierung üblichen reinen 70% igen Alkohol wurden die Abklatschpräparate aus der Schwärmzone 1½ Std in einer 0,5% igen Lösung von $P_2O_5 \cdot 24 WO_3 + xH_2O$ (gelöst in 70% Alkohol) belassen.

Der Erfolg ist gering. Eine wesentliche Kontraststeigerung der fädigen Substanz in den Nucleoiden ist nicht auszumachen. Lediglich die Geißeln treten nunmehr auch im Dünnschnitt hervor, wenn auch infolge der Präparation die Windungen verschwunden sind (Abb. 4). Von einem Basalkorn fehlt jede Spur.

¹ Ähnliche Beobachtungen beschreiben KELLENBERGER u. RYTER (1956) in Zellen von *E. coli*: Die Bakterien zeigen nach der Behandlung mit Lanthannitrat im Innern der „Kernvacuolen“ gleichmäßig verteilte Fadenstrukturen (Durchmesser 40 bis 70 Å).

Zur Morphologie der Hellzone kann man daher zusammenfassend sagen: 1. Durch die verwendeten Kontrastierungsmittel ist die „Kernvacuole“ nicht „elektronenfärbbar“. — 2. In ihrer Elektronendichte gleicht sie in allen Fällen etwa dem Einbettungsmittel des Dünnschnitts.

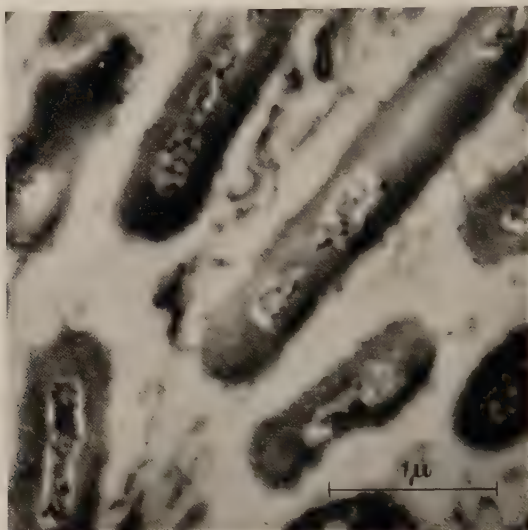


Abb. 4. Längsschnitt durch Schwärmzellen von *Proteus* (Plattenkultur, Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure). Vergr. 21 700 mal

Daraus sowie aus dem weiter unten beschriebenen Verhalten der Fäden bei starker Zellvermehrung in Flüssigkeitskulturen muß gefolgert werden, daß die „Kernvacuole“ leer ist (abgesehen von Wasser und Salzen in lebenden Zellen) und die DNS in den dunklen, fädigen Strukturen gesucht werden muß.

B. Die Verteilung feulgenpositiver Bereiche in Zellen aus Flüssigkeitskulturen

1. Präparation

Mit einer 24 Std alten Flüssigkeitskultur (synthetisches Nährsubstrat nach BELOSERSKI 1939, ohne Agar) wurden 10 cm³-Reagensglas-Ansätze gleichen Nährsubstrates beimpft und 21 Std lang bei 22°C bebrütet, so daß die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase erreicht war. Durch Zentrifugieren (20 min bei 1500 U/min) wurden die Bakterien von der Nährlösung getrennt. Fixation: 80 min in 1% iger, gepufferter OsO₄-Lösung bei +2°C. Nach Abtrennung der Fixierlösung durch Zentrifugieren wurden die Bakterien 3mal je 30 min in Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen, sodann dehydriert und eingebettet. Polymerisation bei 80°C. Herstellung von Dünnschnitten und ihre Untersuchung im Elektronenmikroskop wie S. 18 beschrieben.

2. Innenstrukturen bei Kultivierung in synthetischem Nährsubstrat

Im Bakterienplasma liegen, scheinbar regellos verteilt, elektronendichte Fäden. Sie sind jeweils von einem mehr oder weniger schmalen, hellen Saum umgeben, welcher in seiner Dichte der bei Plattenkulturen beobachteten, oben beschriebenen „Kernvacuole“ entspricht (Abb. 5). Aggregationen der Fäden zu kompakten Innenkörpern sind zwar ab und zu sichtbar, doch erreichen sie in keinem Fall die Ausmaße der bei oberflächenkultivierten Bakterien gefundenen Strukturen. Das mag auch der Grund sein für den unterschiedlichen Ausfall der Feulgen-Reaktion, bei der eine teils diffuse, teils distinkte Anordnung der feulgenpositiven Substanz auftritt (PREUSSER 1958).

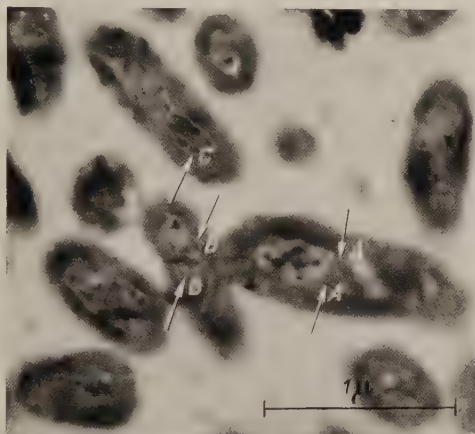


Abb. 5. *Proteus vulgaris* (logarithmische Wachstumsphase, synthetisches Nährsubstrat). Fadenarten:
Typ A (etwa 160 Å Durchmesser), Typ B (etwa 230 Å Durchmesser), Typ C (etwa 300 Å Durchmesser).
Vergr. 25 000mal

Die Dicke der Fäden kann gemessen werden. Da von jedem Faden nur ein relativ kurzes Ende sichtbar ist, wird von jedem deutlich erkennbaren Fadenstück der Durchmesser bestimmt. Man kann dabei 3 Gruppen unterteilen: A mit 156 Å, B mit 229 Å und C mit 303 Å Durchmesser. Über die Anzahl der einzeln gemessenen Fadenstücke, die Extremwerte und die Streuung gibt, ebenso auch für die folgenden Versuche, Tab. 1 (S. 26) Auskunft.

Die unter diesen Bedingungen gewachsenen Bakterien zeigen demnach Innenstrukturen, die erheblich von jenen der auf Platten kultivierten Organismen abweichen. BIRCH-ANDERSEN, MAALØE u. SJÖSTRAND (1953) beschreiben in Schnitten durch *E. coli* eine stark ausgeprägte „Kernvacuole“ vornehmlich in der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien, während in der Ruhephase eine größere Anzahl kleiner Vacuolen sichtbar wird. Nach Ansicht dieser Autoren ist das Kulturalter für die Ausbildung von Bereichen geringer Elektronendichte von Bedeutung.

3. Innenstrukturen von Bakterien aus verschieden alten peptonhaltigen Kulturen

Die Bakterien wurden in Erlenmeyer-Kolben mit 50 cm³ Nährlösung (Pepton S 1%, Liebig's Fleischextrakt 1%, NaCl 0,5%, aqua dest.) bei 37°C kultiviert. Das

Untersuchungsmaterial stammt aus der logarithmischen Wachstumsphase (4 Std), dem Beginn der Ruheperiode (7 Std) sowie der Ruheperiode selbst (24 Std). Siehe Abb. 6.

Tabelle 1. Durchmesser der elektronendichten Fäden in Zellen von *Pr. vulgaris* aus Flüssigkeitskulturen verschiedenen Alters

Nährsubstrat	Entwicklungsstadium	Faden- durchm. (Å)	$\sqrt{\frac{\sum v^2}{n(n-1)}}$	n =	Extremwerte (Å)	
synthetisch (BELO- SERSKI)	log-Phase (21 Std bei 22°C)	156	± 4,8	23	118	184
		229	± 4,4	5	211	250
		303	± 10,7	3	290	324
peptonhaltig	log-Phase (4 Std bei 37°C)	152	± 4,1	31	108	174
		220	± 5,5	14	200	260
		322	± 8,5	12	303	386
peptonhaltig	Beginn der Ruheperiode (7 Std bei 37°C)	147	± 3,6	28	119	180
		219	± 5,2	10	205	243
peptonhaltig	Ruheperiode (24 Std bei 37°C)	146	± 3,5	38	113	174
		210	± 7,2	6	194	242

Trotz dem unterschiedlichen Kulturalter zeigen sich hinsichtlich der Fadenverteilung im Bakterienplasma keine Verschiedenheiten (Abb. 7 bis 9). Auch hier können in keinem Wachstumsstadium echte „Kern-

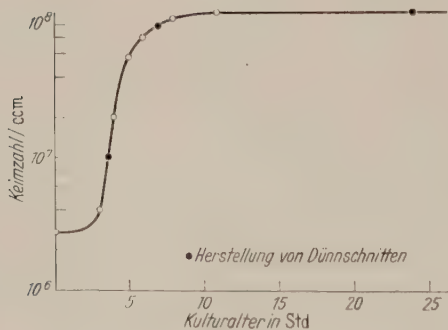


Abb. 6. Wachstumskurve von *Pr. vulgaris* (50 cm³-Ansätze, peptonhaltiges Substrat, 37°C)

vacuolen“ beobachtet werden¹ (vgl. PREUSSER, SCHLOTE u. RIPPEN 1957).

Dickenmessungen der Fäden ergeben ebenfalls je nach dem Kulturalter bemerkenswerte Unterschiede. Man findet, ähnlich wie oben für synthetisches Nährsubstrat beschrieben, 3 verschiedene Fadendurchmesser: Der Fadentyp A kommt in allen drei untersuchten Wachstumsstadien vor, B u. C vornehmlich in der Haupt-

wachstumsperiode (Tab. 1)². Die Fäden sind zumeist von einem schmalen, hellen Saum (dem Rest der „Kernvacuole“) umgeben.

¹ Vorliegende Befunde beziehen sich auf Zellen von *Pr. vulgaris* aus Ruhekulturen. Über die verschiedenartige Ausbildung von „Kernvacuolen“ in Bakterien aus Schüttelkulturen (bessere O₂-Versorgung) soll später berichtet werden.

² Unterschiedliche Durchmesser von Chromatinfäden im Verlauf des Wachstums in Flüssigkeitskulturen wurden auch von CHAPMAN u. KROLL (1957) in Zellen von *Spirillum serpens* beobachtet.

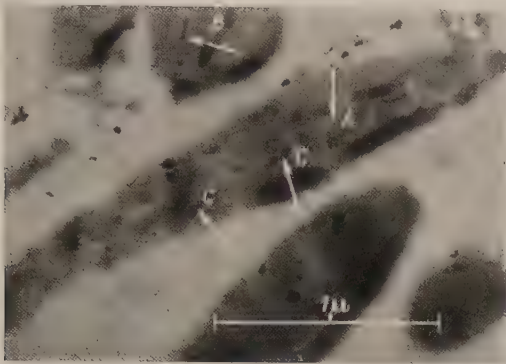


Abb. 7. Schnitt durch *Proteus*-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase. Vergr. 29 500 mal



Abb. 8. Schnitt durch *Proteus*-Zellen aus beginnender Ruheperiode. Vergr. 40 000 mal

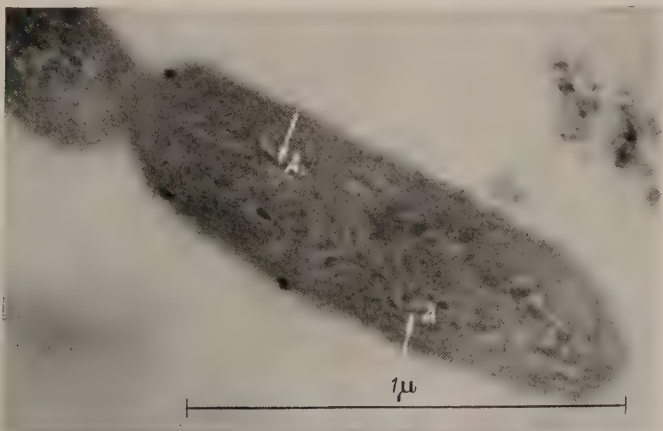


Abb. 9. Schnitt durch *Proteus*-Zellen aus der Ruheperiode. Vergr. 57 000 mal

Diese Befunde kann man folgendermaßen deuten: Da ein Schnitt durch ein Zentrifugat aus der logarithmischen Wachstumsperiode Zellen der verschiedensten Teilungsstadien enthalten muß, so müssen unterschiedliche Fadenstärken von der Vermehrung dieser Gebilde herrühren. Trifft diese Annahme zu, dann sollten auch Doppelfäden zu finden sein. Tatsächlich ist das gelegentlich der Fall (Abb. 10). Bei den etwa 220 Å dicken Fäden, die vornehmlich im Zeitraum stärkster Zellvermehrung auftreten, sollte es sich um Fäden doppelter Querschnittsfläche handeln (2 Fäden von je 150 Å Durchmesser müssen, wenn sich ihre Massen vereinen, einen um $\sqrt{2}$ dickeren Faden ergeben [SCHLOTE, mündl. Mittlg.]). Den Durchmesser von etwa 320 Å kann man entsprechend aus der Vereinigung von 4 Fäden zu je 150 Å Dicke erklären.

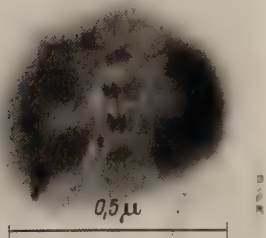


Abb. 10.
Doppelfäden in *Proteus vulgaris* aus
logarithmischer Wachstumsphase
(Durchmesser der Fadenstrukturen
je 130 Å). Vergr. 58 000 mal

Unterschiedliche Durchmesser für Fäden, die er im Innern von Chromosomen findet, beschreibt DE ROBERTIS (1956) nach Untersuchungen von früher Prophase, später Prophase und Metaphase in Spermatocyten I. Ordnung der Heuschrecke. Während der Autor in der frühen Prophase einen mittleren Durchmesser der Fäden von 47 Å angibt, liegen die Werte in der späten Prophase und der Metaphase im Mittel bei 70 Å bzw. 100 Å. Auch hier tritt ein Verhältnis der Fadenstärken von $1 : \sqrt{2} : 2$ auf.

In diesem Zusammenhang sei auf spindelähnliche Strukturen hingewiesen, die während der Teilung von *Pr. vulgaris* zwischen zwei Tochter-, „vacuolen“ zu finden sind (Abb. 11). Die übliche Längsorientierung der feulgenpositiven Fäden in den Bakterien (Abb. 9) scheint zum Zeitpunkt der Teilung in eine Querorientierung überzugehen (Abb. 11).

Wie beschrieben, fällt bei einem Vergleich der Innenstrukturen oberflächenkultivierter Bakterien mit jenen aus Zellen von flüssigem Nährsubstrat die verschiedenartige Ausbildung der „Kernvacuolen“ auf. Dagegen ändert während des Kulturwachstums die Fadenverteilung im Bakterienplasma ihre Konfiguration nicht. Die Beobachtungen von BIRCH-ANDERSEN, MAALOE u. SJÖSTRAND (1953) an *E. coli*, daß die Ausdehnung der „Kernvacuole“ vom Kulturalter abhängig ist, konnte für den untersuchten Stamm von *Proteus vulgaris* damit nicht bestätigt werden. Hier sind vielmehr die jeweiligen Kulturbedingungen für die Form der „Kernvacuole“ von großer Bedeutung. Während in Zellen aus peptonhaltigem Flüssigkeitssubstrat die Fäden regellos im Plasma verteilt liegen — sie werden zumeist von einem mehr oder weniger schmalen, hellen Saum umgeben — deutet sich in Bakterien aus synthetischem,

asparaginhaltigem Nährsubstrat durch einen verbreiterten Saum geringer Elektronendichte, der jeden Faden umgibt, schon „Kernvacuolen“-bildung an. In oberflächenkultivierten Organismen nimmt schließlich eine einzige so entstandene Vacuole, mit der gesamten, zusammengeballten Masse der Fäden im Innern, den größten Teil der Zelle ein [vgl. das Schema Abb. 12 (S. 30)].

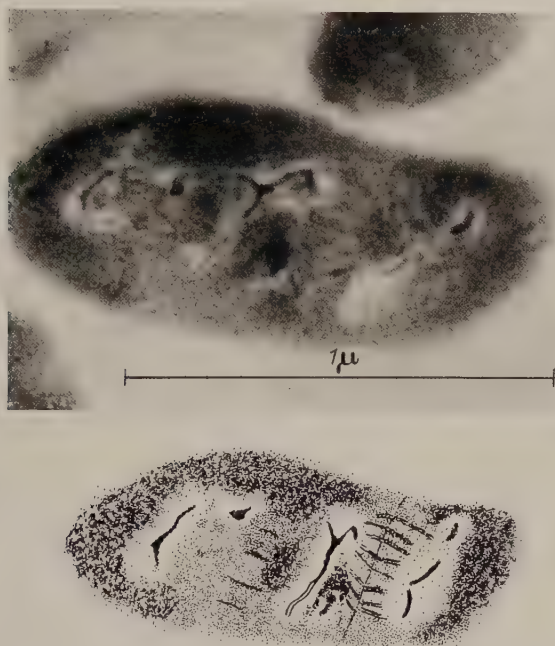


Abb. 11. Spindelähnliche Strukturen verbinden Bereiche geringer Elektronendichte, zwischen denen eine dünne Quermembran angedeutet ist. Fäden liegen senkrecht zur Längsachse des Bacteriums. Vergr. 56000 mal

4. Innenstrukturen bei Kultivierung in stark NaCl-haltiger Nährstoffquelle

Es ist bekannt, daß z. B. Na^+ -Ionen auf Eiweißkolloide einen quellenden Einfluß ausüben. Möglicherweise beruht der Effekt einer diffusen Fadenverteilung also auf einer durch starken Na^+ -Gehalt des Nährsubstrates hervorgerufenen Quellung des Plasma-Eiweißes. Dadurch würde natürlich eine Vacuolenbildung verhindert.

BIRCH-ANDERSEN u. MURRAY (1956) setzten *Bac. cereus* vor der Fixation in OsO_4 -Lösung einige Zeit einer 1-mol Lösung von NaCl aus. Die Autoren beobachteten bei erhöhter Salzkonzentration ein Verschwinden der „Kernvacuole“. Es war zu prüfen, ob sich ein ähnlicher

Einfluß der Salzkonzentration auf die Bezirke geringer Elektronendichte in Zellen von *Proteus* bemerkbar macht, sofern man die Bakterien in stark NaCl-haltigen Nährsubstraten kultiviert.



Abb. 12. Die Verteilung feulgenpositiver Fäden (schematisch). a Bakterien aus peptonhaltigem Flüssigkeitssubstrat; b Bakterien aus synthetischem (asparaginhaltigem) Flüssigkeitssubstrat; c Oberflächenkultivierte Bakterien

Voruntersuchungen zeigten, daß bei 1,5 mol NaCl-Konzentration des peptonhaltigen Flüssigkeitssubstrats (Zusammensetzung S. 25, statt 0,5% jetzt 7,3% NaCl) gerade noch ein schwaches Wachstum des verwendeten Stammes stattfindet. In

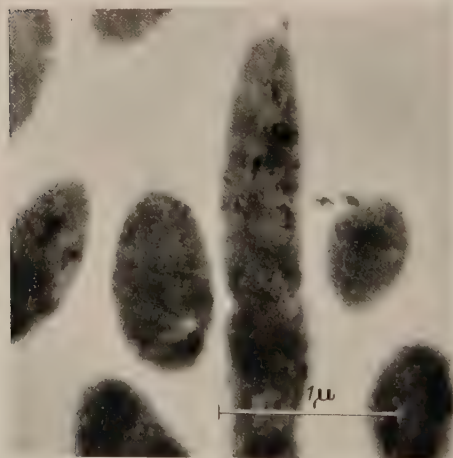


Abb. 13. Schnitt durch *Proteus*-Zellen aus einer Kultur ohne NaCl-Zusatz. Vergr. 24 000mal

100 cm³-Erlenmeyerkolben wurden nun 50 cm³-Kulturen 1. ohne, 2. mit 0,5 mol NaCl und 3. mit 1,5 mol NaCl angesetzt, 19 Std bei 37°C bebrütet und wie vorher präpariert, geschnitten und im Elektronenmikroskop untersucht.

Kultur 1 (ohne NaCl): Eine regellose Verteilung der Fadenstrukturen im Bakterienplasma ist für Zellen aus Kulturen ohne NaCl-Zusatz typisch. Dabei tritt der Einzeladen zwar in Erscheinung, hebt sich aber, da die „Kernvacuole“ völlig fehlt, nur so schwach vom Zellplasma ab, daß es schwer ist, ihn zu erkennen¹ (Abb. 13).

¹ Das völlige Fehlen elektronenheller Bereiche im Zellplasma wird möglicherweise durch die Kultivierung in NaCl-freier Nährlösung hervorgerufen (die Kulturen der Abb. 8 u. 9 wuchsen in Gegenwart von 0,5% NaCl).

Kultur 2 (0,5 mol NaCl): Die fadenförmigen Zellbestandteile erscheinen als mehr oder weniger zusammengeballte, kontrastreiche Körper, die in Bereichen geringer Elektronendichte liegen (beginnende „Kernvacuolen“bildung; Abb. 14).

Kultur 3 (1,5 mol NaCl): Bakterien aus einer Kultur mit 1,5 mol NaCl zeigen im Schnitt eine ausgesprochene „Kernvacuole“, wie sie schon bei Dünnschnitten oberflächenkultivierter Bakterien beschrieben wurde. Die fädige Beschaffenheit der elektronendichten Strukturen ist gelegentlich noch zu beobachten (Abb. 15).

Während also BIRCH-ANDERSEN u. MURRAY (1956) in Zellen von *E. coli*, die vor der Fixation in 1 mol NaCl-Lösung belassen wurden, gegenüber unbehandelten Präparaten ein Verschwinden der „Kernvacuole“ bemerkten, wird nach den eigenen Befunden in Zellen von *Proteus* der umgekehrte Effekt erzielt, sofern man die Bakterien direkt in stark NaCl-haltigem Substrat kultiviert. Eine Entquellung des Bakterienplasmas kann in diesem Fall demnach nicht die Bildung von „Kernvacuolen“ auslösen.

C. Grenzschicht zwischen „Kernvacuole“ und Bakterienplasma

BIRCH-ANDERSEN, MAALØE

u. SJÖSTRAND (1953) wiesen

darauf hin, daß der Begriff „Bakterienkern“ für die Vacuole nicht angewendet werden darf, da bisher in keinem Fall eine Kernmembran beobachtet werden konnte.

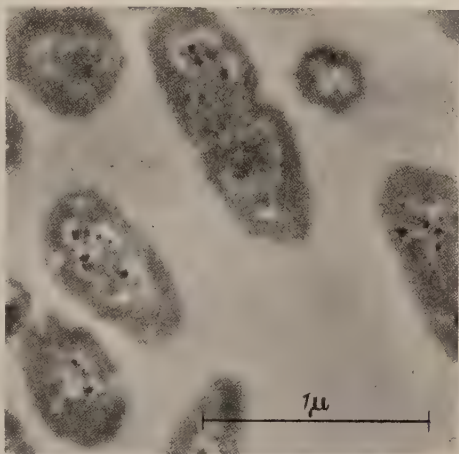


Abb. 14. Schnitt durch *Proteus*-Zellen aus einer Kultur mit 0,5 mol NaCl-Zusatz. Vergr. 30 000 mal

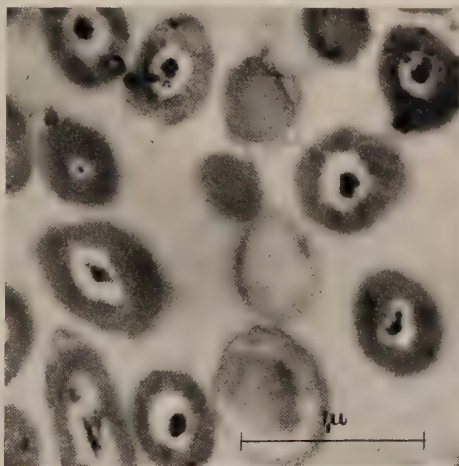


Abb. 15. Schnitt durch *Proteus*-Zellen aus einer Kultur mit 1,5 mol NaCl. Vergr. 24 000 mal

Nach eigenen Befunden können die in oberflächenkultivierten Bakterien sowie in Zellen aus stark NaCl-haltigen Nährlösungen sichtbaren Bereiche geringer Elektronendichte durch eine Grenzschicht vom umgebenden Plasma abgesetzt sein (Abb. 16). Diese, aus Aneinanderlagerung zahlreicher dunkler Granula gebildete Schicht in Analogie zu den

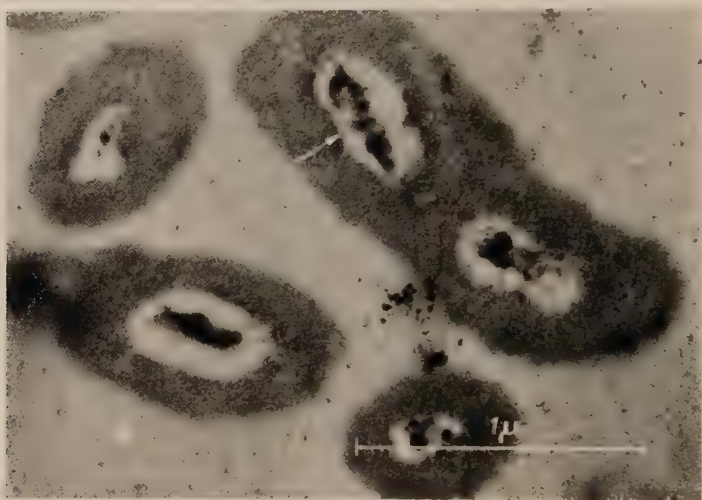


Abb. 16. Schnitt durch Bakterien aus einer Kultur mit 1,5 mol NaCl-Zusatz. Grenzschicht zwischen „Kernvacuole“ und Bakterienplasma. Vergr. 37 500 mal

Kernmembranen höherer Organismen eine echte Kernmembran zu nennen, wäre jedoch wenig glücklich, da hier niemals die dort stets vorhandene doppelte Konturierung beobachtet wurde.

Schlußbetrachtungen

1. Vergrößerungsbestimmung

Die Arbeit wurde mit einem Siemens-Übermikroskop (ÜM 21, Baujahr 1939) angefertigt. Da ursprünglich Rastenschalter fehlten, betrug die Meßgenauigkeit nur etwa 10%. Sie wurde mit Einbau einer Durchfocuseinrichtung, die Stufenschaltung in Objektiv und Projektiv enthält (SCHLOTE 1958), soweit verbessert, daß jeder Vergrößerungswert auf weniger als $\pm 5\%$ reproduzierbar ist. Durch verschiedene Linsenfehler bedingt, liegt die Auflösungsgrenze des Geräts bei 60 Å.

Schrumpfungen der Präparate bei Dehydrierung und Einbettung sowie der Schnitte im Elektronenstrahl bewirken eine Verkleinerung der Objekte von etwa 10% (vgl. BAHR, BLOOM u. FRIBERG 1957). Da alle Dünnschnittpräparate praktisch gleich behandelt wurden, so können die

Meßwerte untereinander verglichen werden, sind jedoch nicht als Absolutwerte aufzufassen.

Zur Vergrößerungsbestimmung dienten Latex-Partikel (Durchmesser $0,138 \mu$).

2. Diskussion der Ergebnisse

Nach Untersuchungen von BIRCH-ANDERSEN, MAALØE u. SJÖSTRAND (1953) ist bei *E. coli* die „Kernvacuole“ je nach dem Alter einer Flüssigkeitskultur verschieden stark ausgebildet. Auch PIEKARSKI u. GIESBRECHT (1956) sowie PIEKARSKI u. PONTIERI (1956) finden in flüssigkeitskultivierten Zellen von *Bac. megaterium* bzw. *E. coli* große „Kernvacuolen“ im Zellinnern. Bei *Proteus vulgaris* liegen nach den hier beschriebenen Beobachtungen die Dinge anders.

Sofern das Bakterium in nicht geschütteltem flüssigem peptonhaltigem Nährsubstrat wächst, ist die feulgenpositive Substanz regellos im Bakterienplasma verteilt. Elektronenmikroskopisch finden sich — im Bereich des Meßfehlers — Fäden von $150, 150 \cdot \sqrt{2} \approx 220$ und $2 \cdot 150 = 300 \text{ Å}$ Durchmesser, die entweder unmittelbar an das umgebende Bakterienplasma grenzen oder von diesem durch einen Bereich geringer Elektronendichte getrennt sind. Dagegen weisen oberflächenkultivierte Zellen scharf voneinander getrennte feulgenpositive Bereiche auf (Lichtmikroskopie PREUSSER 1958) bzw. im Dünnschnitt „Kernvacuolen“ mit elektronendichter, fädiger Substanz im Innern. Aber auch die Verteilung der Fäden in flüssigkeitskultivierten Zellen läßt sich dahingehend ändern, daß die Bakterien Nucleoide mit großen „Kernvacuolen“ enthalten. Man muß dazu die Zellen in stark NaCl-haltigen Nährsubstraten wachsen lassen. Je nach Konzentration des NaCl finden sich alle Übergangsformen zwischen echter „Kernvacuole“ und diffuser Verteilung der Fäden im Bakterienplasma.

Hier muß zunächst die Frage geklärt werden, inwieweit die abgebildeten Strukturen Artefakte darstellen können, welche durch die Präparation hervorgerufen werden. Als „Artefakt“ soll dabei das bezeichnet werden, was durch die Abtötung der lebenden Zelle und die Nachbehandlung bis zum fertigen Elektronenbild strukturell verändert wird. Insbesondere die Fixationsartefakte wären eingehend zu besprechen. Alle auf die Fixierung folgenden Veränderungen des Objektes — Schrumpfung bei der Dehydrierung und Einbettung, Zerreißen durch den Polymerisationsvorgang des Einbettmittels, das Zusammensintern feinsten Strukturen im Elektronenstrahl, sofern die Strahlintensität zu stark erhöht wird — sind in einer Reihe von Arbeiten anderer Autoren (z. B. MAALØE u. BIRCH-ANDERSEN 1956) an verschiedenen Objekten untersucht worden, seither deutbar bzw. vermeidbar und können hier unberücksichtigt bleiben.

Um auf Artefakte schließen zu können, muß die Struktur der lebenden Zelle bekannt sein. Die für derartige Vergleiche üblichen Methoden (Polarisationsmikroskopie, Herstellung von Röntgendiagrammen usw.) lassen sich bei Bakterien nicht anwenden, weil ihre Zellen keine kristalloiden Strukturen enthalten. Auch das Phasenkontrastverfahren muß versagen, weil sein Auflösungsvermögen nicht ausreicht.

Damit sind die oben beschriebenen chromonemaähnlichen Fäden selbst einer direkten Beobachtung im Leben nicht zugänglich. Jedoch kann man summarisch die Verteilung der feulgenpositiven Substanz in Beziehung setzen zur Anordnung der Nucleoide im Phasenkontrast und dies vergleichen mit den Befunden an Dünnschnitten. So betonen KNÖLL u. ZAPF (1954), daß die an lichtmikroskopischen Lebendpräparaten zahlreicher grampositiver Bakterien bei Phasenkontrastbeobachtung aufgefundenen Hellzonen auch elektronenmikroskopisch bei der Durchstrahlung von Totalpräparaten als Bereiche mit geringer Elektronendichte sichtbar werden. Es steht wohl außer Zweifel, daß man diese Zonen in Dünnschnitten dann als „Kernvacuolen“ wiederfindet.

Wenn außerdem die nach Fixation und Färbung erhaltene Verteilung der feulgenpositiven Substanz von der im Phasenkontrast dargestellten Verteilung der Hellzonen nicht abweicht, dann müßten die regellos in der Bakterienzelle verteilten elektronendichten Fäden, deren Dicke zudem sehr gleichförmig ist und nur je nach Kulturalter gesetzmäßig mit $\sqrt{2}$ variiert, ebenfalls DNS enthalten. Diese fadenförmigen Zellbestandteile scheinen aus einer elektronendichten Hülle mit heller Seele zu bestehen. Ähnliche Beobachtungen wurden von RIS (1956) bei Schnitten durch Antheren von *Lilium longiflorum* gemacht. Es ist möglich, daß es sich in beiden Fällen um Strukturen handelt, die in Analogie zueinander stehen. Man wird bei den in Bakterien gefundenen Fäden jedoch erst dann von Chromosomen sprechen können, wenn der Mitosecyclus eindeutig geklärt ist. Chemische Untersuchungen über den Teilungsmechanismus von Bakterienchromosomen wurden von DE LAMATER (1956) an *Bac. megaterium* und *E. coli* durchgeführt, doch ist, wie aus den eigenen Befunden hervorgeht, auch auf übermikroskopischem Wege eine Klärung dieser Frage durchaus möglich. Ansatzpunkte hierfür bilden spindelähnliche Strukturen in Teilungsstadien von *Proteus*.

Die Entmischung der feulgenpositiven Substanz, die nach Kultivierung der Zellen in 1,5 mol NaCl enthaltender Nährlösung eintritt, ist kein Artefakt, sondern ein biologisches Phänomen. Sie mag mit einer verringerten Vermehrungsfähigkeit der Bakterien einhergehen. Entscheidend ist jedoch die Tatsache, daß sich die Zellen überhaupt in dieser Nährlösung weiter vermehrt haben. Der Mechanismus der identischen Reproduktion der Kernsubstanz hat also unter diesen Kulturbedingungen noch nicht versagt, so daß man in lebenden Bakterien je nach den

Kulturbedingungen eine unterschiedliche Verteilung der feulgenpositiven Substanz annehmen muß¹.

Die knäuelartige Anordnung der elektronendichten Fäden im Innern der „Kernvacuolen“, die vielen Autoren bisher ein Abmessen der Fäden verwehrte, dürfte auf eine Zusammenballung während Fixation und Nachbehandlung zurückzuführen sein. Dafür sprechen die Kontrastierungsversuche mit Lanthannitrat und Phosphorwolframsäure. Man gewinnt den Eindruck, als ob die Kernfäden lebender Zellen mehr oder weniger frei in der „Kernvacuole“ herumschwimmen, durch die Fixierung jedoch zusammengeballt werden und sich in der Nachbehandlung, je nach der Aufladung, welche sie durch Kontrastiermittel und andere Ionen erfahren, in wechselndem Grade wieder auflockern können.

Es kann noch nicht gesagt werden, wie sich das DNS-Modell von WATSON u. CRICK (1953), welches Fadenstärken von nur 20 Å Durchmesser liefern sollte, zu den hier aufgefundenen verhältnismäßig hohen Fadendurchmessern verhält. Weitere Befunde hochauflösender Elektronenmikroskopie zu diesem Problem sind daher abzuwarten.

Nach diesen Ergebnissen erscheint es angebracht, den Begriff „Nucleoid“ nicht uneingeschränkt bei Bakterien anzuwenden. So distinkte Strukturen, daß man sie Nucleoid nennen könnte, treten nur unter ganz bestimmten Kulturbedingungen in den Zellen auf, können jedoch nach Änderung des Kulturmilieus fehlen. Es ist morphologisch keinerlei Analogie zu Kernen höherer Organismen vorhanden. Man sollte daher nur mit großen Vorbehalten von kernähnlichen Strukturen sprechen. Mit dem Begriff „offener Zellkern“² würde man wohl am besten die verschiedenartige Verteilung feulgenpositiver Substanz veranschaulichen, wie sie in Zellen des untersuchten Stammes von *Proteus vulgaris* angetroffen wurde.

In Zellen aus Plattenkulturen sind in jedem Fall „Nucleoide“ sichtbar. Es müßte hier in erster Linie die Ionenkonzentration in dem dünnen Flüssigkeitsfilm an der Agaroberfläche geprüft werden, in welchem sich

¹ Zusammenballungen von Bakterien-Chromatin zu elektronendichten Körpern fanden auch WHITFIELD u. MURRAY (1956) bei Kultivierung verschiedener Bakterien unter extremen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, tiefe Temperatur, UV-Strahlung, Nährstoffmangel usw.). Solche Aggregationen in Bakterien können ohne Verlust der Lebensfähigkeit ausgelöst und z. B. durch Änderung der Ionenzusammensetzung des Nährsubstrates wieder rückgängig gemacht werden.

² Dieser Begriff wurde schon von HIERONYMUS (Beitr. z. Biol. d. Pfl. 5, 480, 1892) für die Verteilung des Chromatins in älteren Zellen von Cyanophyceen geprägt. Der Autor beobachtete in jungen Zellen von Oscillatorien einen völlig abgeschlossenen und abgerundeten Zellkern, den er als „geschlossenen Zustand“ bezeichnete. In älteren Zellen zeigte sich eine Auflockerung des Fadens, der den „Centralkörper“ bildet, und seine Verbreitung durch das ganze Zellplasma. In diesem Fall spricht HIERONYMUS von einem „offenen Zellkern“.

die Bakterien bewegen. Außerdem könnte eine Plattenkultivierung bei unterschiedlicher Wasserdampfspannung Hinweise zum Problem der Vacuolenbildung liefern¹.

Zusammenfassung

1. Dünnschnitte durch *Proteus vulgaris* nach Plattenkultivierung:

a) Es wird eine Präparationsmethode beschrieben, die Längsschnitte durch Schwärmzellen zu machen gestattet.

b) In allen Entwicklungsstadien sind „Kernvacuolen“ mit stark zusammengeballten, elektronendichten Fäden im Inneren sichtbar. Die chemische Natur der fadenförmigen Zellbestandteile wird diskutiert.

c) In Schwärmzellen beträgt der Abstand der „Kernvacuolen“ voneinander $0,94 \pm 0,02 \mu$. Er ist also im Bereich des Fehlers der gleiche wie der der lichtmikroskopisch nachgewiesenen feulgenpositiven Bereiche.

d) Durch Lanthannitrat werden die Innenstrukturen der Zellen verändert.

e) Phosphorwolframsäure ruft keine Kontraststeigerung der fadenförmigen Zellsubstanz hervor, macht jedoch die Geißeln auch im Dünnschnitt sichtbar.

2. Dünnschnitte durch *Proteus vulgaris* nach Flüssigkeitskultivierung:

a) Elektronendichte Fäden liegen regellos im Plasma verteilt. Lichtmikroskopisch zeigt sich eine gleichmäßig positive Feulgen-Reaktion der ganzen Zelle (PREUSSER 1958).

b) In der Ruheperiode der Kultur beträgt in den Bakterien der Durchmesser eines Fadens etwa 150 Å. Neben Fäden dieser Dicke treten — besonders in der logarithmischen Wachstumsphase — Fadenstrukturen mit doppelter und vierfacher Querschnittsfläche sowie Doppelfäden auf.

c) Es werden bei sich teilenden Bakterien spindelähnliche Strukturen beschrieben.

d) Durch Kultivierung der Bakterien in Substraten mit steigendem NaCl-Gehalt kann ein kontinuierlicher Übergang von regelloser Fadenverteilung im Bakterienplasma zu distinkten „Kernvacuolen“ erzeugt werden.

Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Göttinger Akademie der Wissenschaften.

Vom Hygiene-Institut der Universität Göttingen wurde mir der Stamm 556 von *Proteus vulgaris* freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

¹ PIETSCHMANN u. RIPPPEL (1932) beobachteten bei oberflächenkultivierten Zellen von *Bac. mycoides* eine diffuse positive Feulgenreaktion. Es scheint daher angebracht, vorliegende Befunde nicht uneingeschränkt auf andere Bakterienarten zu übertragen.

Literatur

BAHR, G. F.: *Exper. Cell. Res.* **6**, 506 (1954). — BAHR, G. F., G. BLOOM and U. FRIBERG: *Exper. Cell. Res.* **12**, 342 (1957). — BASSERMANN, F. J.: *Beitr. Klin. Tbk.* **115**, 173 (1955/56). — Z. *Naturforsch.* **11b**, 276 (1956). — BELOSERSKI, A. N.: *Mikrobiologija* **8**, 504 (1939). — BIRCH-ANDERSEN, A., O. MAALØE and F. S. SJÖSTRAND: *Biochim. et Biophysica Acta* **12**, 395 (1953). — BIRCH-ANDERSEN, A., u. R. G. E. MURRAY: Vortrag, gehalten auf der 1. europäischen Konferenz für Elektronenmikroskopie. Stockholm 1956. — BRAUN, W.: *Bacterial genetics*, S. 38ff. Philadelphia—London 1953.

CASPERSSON, T.: *Skand. Arch. Physiol.* **73**, Suppl. 8 (1936). — CASPERSSON, T., a. E., and H. HAMMARSTEN: *Transact. Faraday Soc.* **31**, 367 (1935). — CHAPMAN, G. B., and A. J. KROLL: *J. Bacter.* **73**, 63 (1957).

DE LAMATER, E. D.: *Bacterial anatomy* (6. Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol., London), S. 215ff. Cambridge 1956.

GAY, H.: *Stain Technol.* **30**, 239 (1955).

HOUWINK, A. L., and W. VAN ITERSOM: *Biochim. et Biophysica Acta* **5**, 10 (1950).

KELLENBERGER, E., u. A. RYTER: *Schweiz. Z. allg. Path.* **18**, 1122 (1955). — *Experientia* (Basel) **12**, 420 (1956). — KNÖLL, H., u. K. ZAPF: *Zbl. Bakter., I. Orig.* **161**, 241 (1954).

MAALØE, O., and A. BIRCH-ANDERSEN: *Bacterial anatomy* (6. Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol., London), S. 261ff. Cambridge 1956. — MAALØE, O., A. BIRCH-ANDERSEN and F. S. SJÖSTRAND: *Biochim. et Biophysica Acta* **15**, 12 (1954). — MURRAY, R. G. E.: Symp. on bact. cytology, 6. internat. Mikrobiologenkongreß, Rom 1953.

NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: *Arch. Mikrobiol.* **23**, 123 (1955).

ORNSTEIN, L.: *J. biophys. and biochem. cytol.* **3**, 809 (1957).

PIEKARSKI, G.: *Arch. Mikrobiol.* **8**, 428 (1937); **11**, 406 (1940). — *Erg. Hyg.* **26**, 333 (1949). — PIEKARSKI, G., u. P. GIESBRECHT: *Naturwissenschaften* **43**, 89 (1956). — PIEKARSKI, G., u. H. RUSKA: *Klin. Wschr.* **1939**, 383. — *Arch. Mikrobiol.* **10**, 302 (1939). — PIEKARSKI, G., u. G. M. PONTIERI: *Zbl. Bakter., I. Orig.* **165**, 242 (1956). — PIETSCHMANN, K., u. A. RIPPEL: *Arch. Mikrobiol.* **3**, 422 (1932). — PREUSSER, H. J.: *Arch. Mikrobiol.* 1958 (im Druck). — PREUSSER, H. J., F. W. SCHLOTE u. A. RIPPEL-BALDES: *Naturwissenschaften* **44**, 186 (1957).

RINKER, J. N., and H. KOFFLER: *Abstr. of Papers*, 49th Gen. Meeting Soc. Amer. Bacter., S. 28ff. (1949). — *J. Bacter.* **61**, 421 (1951). — RIS, H.: *J. of biophys. and biochem. cytol.* **2**, 385 (1956). — ROBINOW, C. F.: *J. Bacter.* **66**, 300 (1953). — *Bact. Reviews* **20**, 207 (1956).

SCHLOTE, F. W.: *Z. wiss. Mikrosk.* 1958 (im Druck). — STILLE, B.: *Arch. Mikrobiol.* **8**, 125 (1937).

TOMLIN, S. G., and J. M. MAY: *Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci.* **33**, 249 (1955).

WATSON, J. D., and F. H. C. CRICK: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **18**, 123 (1953). — WHITFIELD, J. F., and R. G. E. MURRAY: *Can. J. of Microbiol.* **2**, 245 (1956).

ZEITLER, E., and G. F. BAHR: *Exper. Cell. Res.* **12**, 44 (1957).

(Department of Botany, University of Michigan, Ann Arbor, Mich.)

Physiology of the Cell Surface of *Neurospora* Ascospores

Entrance of anions and non-polar compounds*

By

A. SUSSMAN, R. HOLTON and BERTA VON BÖVENTER-HEIDENHAIN

With 8 Figures in the Text

(Eingegangen am 23. September 1957)

In connection with studies of dormancy in ascospores of *Neurospora tetrasperma*, the changes in their permeability after activation have been investigated. In a previous publication (LOWRY et al. 1957), the adsorption of cations to the cell surface has been described. The penetration of cations, as judged by their effect upon respiration and germination, did not occur until almost two hours after activation. This was true for inorganic cations like Ag^+ , UO_2^{++} and Cu^{++} as well as for organic ones like polymyxin-B. These materials were excluded from those sites within the cell which were sensitive to them and were only adsorbed just before the first visible signs of germination could be detected. Support for these conclusions derives also from studies of the electrophoretic mobility of these cells wherein it has been shown that they possess a strong negative charge (LOWRY and SUSSMAN, unpublished). The work to be reported below was undertaken in order to supplement the data on the uptake of cations with information concerning the penetration of anions and of certain non-polar compounds.

Materials and Methods

Ascospores were obtained largely as described by GODDARD (1935); however, strains 377.4 and 377.5 were crossed and grown at 27° C. After being harvested, the ascospores were stored in a cold-room at 4° C. Activation was usually accomplished by heating at 58° C for 10 to 20 minutes in a thermostated water bath. Such techniques as the estimation of ascospore concentration, incubation of spores after activation, and the procedures used in counting the percentage germination were as described in SUSSMAN (1954). Unless otherwise noted, a final concentration of 0.5 mg. of ascospores per ml. was used.

Respirometric measurements were performed as described by UMBREIT, BURRIS and STAUFFER (1949). In general a total of 1.2 ml. of fluid was used in Warburg vessels of approximately 7 ml. capacity. Into each vessel 0.9 ml of distilled water were pipetted, and then either 2.0 mg. of activated or 9.0 mg. of dormant ascospores

* This work was made possible by a grant from the Michigan-Memorial Phoenix Project of the University of Michigan to whom the authors would like to express their gratitude.

were added; 0.1 ml. of the substance to be tipped were added from the sidearm. The 20% (w/v) KOH used as an absorbent for CO₂ comprised the rest of the volume and was added to the well in the main compartment of the vessel. In the experiments, wherein anaerobic conditions were imposed, a gas mixture of 95% nitrogen and 5% CO₂ was used. This mixture was freed of oxygen by being passed over hot reduced copper turnings before use.

The chemicals used in these experiments were of reagent grade. Sodium fluoroacetate, obtained through the courtesy of Dr. THEODORE BRODY, Department of Pharmacology, University of Michigan, was recrystallized twice from alcohol before being used. Monochloroacetic and dichloroacetic acid were obtained through the courtesy of Kay-Fries Chemicals, Inc., New York 16, N.Y. The 5-nitro-2-furfuryl methyl ether used in these experiments was obtained through the cooperation of Dr. JOHN YURCHENKO of the Eaton Laboratories, Norwich, N.Y.

Fluoride was analyzed by the method of HUNTER, MACNULTY and TERRY (1953), wherein the bleaching of an aluminium-hematoxylin lake was studied spectrophotometrically at 570 μ .

P³² determinations were made by means of an end window counter and scaler, and enough counts were made to assure less than 2% counting error. The aluminium planchets contained 0.3 ml of the dried sample. Phosphorus concentrations were determined by the method of FISKE and SUBBAROW (1925).

Results

The effect of various anions upon the germination of ascospores of *N. tetrasperma* was studied by mixing 1 ml. of a suspension containing 1 mg. of spores per ml. with an equal volume of various concentrations of the anion to be tested. Incubation of the spores and the determination of the percentage germination were done in the usual way; the results are outlined in Table 1. The data show the toxicity of cyanide, azide, fluoride, cysteine und dichloroacetic acid, which are effective at concentrations greater than $1 \cdot 10^{-4}$ m. The rest of the substances used are about one-tenth as effective as these.

That cations are adsorbed on the surface of dormant ascospores and do not gain access to sensitive sites in the cell until germination occurs has been shown by LOWRY et al. (1957). To test the effect of anions, a suspension of dormant ascospores was mixed with an equal volume of various concentrations of the toxic anions used in the experiment described above. In order to insure that no dissociation occurred, the solutions of the poisons were made up in 0.1 n HCl and the ascospores were exposed to these substances for varying periods of time. (It had previously been determined that dormant cells are not affected by incubation in 0.05 n HCl, which was the final concentration in the mixtures after the ascospores had been added.) Thereupon, the spores were washed free of the poisons by 4 rinses of distilled water, activated, incubated, and the percentage germination determined as before. The data in Table 2 disclose that in all cases more poison is needed to prevent germination of the dormant than of the activated spores.

Some insight into the kinetics of fluoride inhibition was sought by exposing dormant ascospores to various concentrations of this substance for varying intervals of time. In order to remove the residual fluoride, the spores were rinsed in 3 changes of distilled water, after which they were activated and incubated. Table 3 provides the results, which indicate that, when $1 \cdot 10^{-2}$ m is used, enough of the poison is taken up in 10 minutes to insure complete toxicity. On the other hand, when $1 \cdot 10^{-3}$ m is used, an hour or more is required in order to achieve the same amount of toxicity.

Table 1. *Toxicity of anions after continual incubation with activated ascospores of N. tetrasperma*

The poisons were dissolved in water and mixed with the spores after activation

Substance	concentr. (molar)	percent. germin.	Substance	concentr. (molar)	percent. germin.
sodium azide	$1 \cdot 10^{-3}$	0	acetic acid	$1 \cdot 10^{-2}$	0
	$1 \cdot 10^{-4}$	78		$1 \cdot 10^{-3}$	84
	$1 \cdot 10^{-5}$	90	sodium arsenite	$1 \cdot 10^{-2}$	0
sodium fluoride	$1 \cdot 10^{-2}$	0		$1 \cdot 10^{-3}$	49
sodium				$1 \cdot 10^{-4}$	90
fluoroacetate	$1 \cdot 10^{-2}$	0	propionic acid	$1 \cdot 10^{-2}$	0
formic acid	$1 \cdot 10^{-2}$	0		$1 \cdot 10^{-3}$	94
	$1 \cdot 10^{-3}$	86	butyric acid	$1 \cdot 10^{-2}$	0
formaldehyde	$1 \cdot 10^{-2}$	80 ¹		$1 \cdot 10^{-3}$	93
	$1 \cdot 10^{-3}$	93	l-cysteine	$1 \cdot 10^{-3}$	0
monochloroacetic	$1 \cdot 10^{-2}$	0			
acid	$1 \cdot 10^{-3}$	94	potassium	$1 \cdot 10^{-2}$	0
dichloroacetic	$1 \cdot 10^{-2}$	0	cyanide	$1 \cdot 10^{-3}$	66 ¹
acid	$1 \cdot 10^{-3}$	0		$1 \cdot 10^{-4}$	94
	$1 \cdot 10^{-4}$	94			

¹ Germ buds only, no germ tubes formed.

This experiment was repeated with sodium azide and sodium fluoroacetate in 0.1 n HCl; the results (Table 4) suggest that these substances penetrate the dormant ascospores more slowly than does fluoride.

Superficially, at least, the results obtained with fluoride and other toxic anions resemble those reported with cations. That is, the toxicity of the anions was much greater when activated cells were continually incubated in the substances than when only dormant cells were treated. It was therefore of interest to consider the possibility that anions, like cations, are bound to the surface of the ascospores.

One approach to this question was to attempt to remove the toxicity by eluting the anion. If these materials were bound to the surface of the cell, such elution should have been feasible. Consequently, ascospores were incubated in acidified $1 \cdot 10^{-2}$ m sodium fluoride for 30 minutes and

afterwards washed free of fluoride and resuspended in 0.1 m solutions of various halogen salts for 30 minutes. These were removed as before, and the spores were activated and incubated. In no case, including potassium iodide, potassium bromide, potassium chloride, calcium chloride, did any of the halogens remove the effect of fluoride.

Table 2. *Effect of treatment of dormant ascospores of N. tetrasperma with acids, prior to activation*

The experiments were performed in 0.05 n HCl and the final pH was between 1.5 and 2.0 unless otherwise noted. After being incubated for the stated time the spores were washed free of the poison, activated, and the percentage germination determined

Substance	molar concentration	time of incubation in acid	percentage germination
hydrazoic acid	$1 \cdot 10^{-2}$	60 min	0
hydrofluoric acid	$1 \cdot 10^{-2}$	10 min	0
	$1 \cdot 10^{-3}$	1 hour	30
	$1 \cdot 10^{-3}$	2 hours	0
fluoroacetic acid	$1 \cdot 10^{-3}$	3 hours	77
	$1 \cdot 10^{-3}$	24 hours	0
	$1 \cdot 10^{-2}$	3 hours	36
	$1 \cdot 10^{-2}$	24 hours	0
formic acid	$1 \cdot 10^0$	30 min	3
	$1 \cdot 10^{-1}$	30 min	91
formaldehyde	$1 \cdot 10^0$	30 min	84
	$1 \cdot 10^{-1}$	30 min	96
monochloroacetic acid	$1 \cdot 10^0$	2 hours	1
	$1 \cdot 10^0$	30 min	79
	$1 \cdot 10^{-1}$	24 hours	0
	$1 \cdot 10^{-1}$	2 hours	81
dichloroacetic acid	$1 \cdot 10^0$	24 hours	27
	$1 \cdot 10^0$	2 hours	92
	$1 \cdot 10^{-1}$	24 hours	90
acetic acid	$1 \cdot 10^0$	24 hours	0
	$1 \cdot 10^0$	2 hours	91
	$1 \cdot 10^{-1}$	24 hours	90
arsenious acid	$1 \cdot 10^{-2}$	24 hours	90
malonic acid (pH 2.3)	$1 \cdot 10^{-2}$	24 hours	95
propionic acid	$1 \cdot 10^{-2}$	24 hours	90
butyric acid	$1 \cdot 10^{-2}$	24 hours	92
l-cysteine	$1 \cdot 10^{-2}$	24 hours	92

Influence of pH. It had been noted in previous experiments that the pH had a marked influence upon the toxicity of acetate (SUSSMAN 1954) toward ascospores of *N. tetrasperma*. In order to determine whether such an effect was general for anions, experiments were carried out with fluoride wherein the pH of $2 \cdot 10^{-2}$ m and $2 \cdot 10^{-3}$ m solutions was varied by the use of NaOH. Equal volumes of these solutions and of dormant

Table 3. *Effect of fluoride upon the germination of ascospores of N. tetrasperma*
 A final concentration of 0.5 mg. of ascospores per ml. was incubated for various times with sodium fluoride. The residual fluoride was removed by 3 rinses in distilled water, after which the ascospores were activated and incubated in distilled water. All solutions of the poison were made up in 0.1 n HCl, and controls were run in the same concentration of acid without the poison

Time of incubation in poison (minutes)	percentage germination in the following concentrations of NaF			
	$1 \cdot 10^{-2}$ m	$1 \cdot 10^{-3}$ m	$1 \cdot 10^{-4}$ m	control
10	0	96	96	95
20	0	85	95	95
30	0	51	95	90
60	0	3	94	92
10	0	94	89	86
20	0	81	92	94
30	0	67	87	91
60	0	6	93	93
120	0	1	95	95

Table 4. *Effect of fluoroacetic acid and hydrazoic acid upon germination of ascospores of Neurospora tetrasperma*

A final concentration of 0.5 mg. of ascospores per ml. was incubated for various times in several concentrations of each inhibitor. The residuum was removed by 3 rinses in distilled water, after which the ascospores were activated and incubated in distilled water. All solutions of the poisons were made up in 0.1 n HCl, and controls were run in the same concentration of acid without the poison

Time of incubation in poison (minutes)	percentage germination			
	$1 \cdot 10^{-2}$ m	$1 \cdot 10^{-3}$ m	$1 \cdot 10^{-4}$ m	control
Fluoroacetic acid				
10	78	91	83	97
20	76	93	92	93
30	69	89	90	90
60	26	87	93	95
120	8	85	95	95
180	3	77	91	90
Hydrazoic acid				
10	92	97	95	96
20	97	95	92	95
30	60	95	93	95
60	0	95	97	94
120	0	88	96	97

ascospores (1 mg. per ml.) were mixed, activated, and the percentage germination determined. The results are plotted in Fig. 1. The data show that the lower the p_H , the greater the effect of fluoride; a variation of only about 0.5 of a p_H unit spells the difference between complete toxicity and no effect.

A similar experiment was performed with azide, in which the p_H was poised by either phosphate or MacIlwain's buffer system. The data in Table 5 disclose that, as in the case of fluoride, the toxicity of azide varies inversely with the p_H . Furthermore, this effect does not seem to be related to the type of buffer used, for the results were identical whether phosphate or MacIlwain's buffer was used.

Activated ascospores respond in the same way to the addition of fluoroacetate. In this experiment, the p_H of the solution containing $2 \cdot 10^{-2}$ m fluoroacetate was altered by the addition of HCl, and equal parts of this and an activated spore suspension were mixed. Incubation was continued at 20°C for 3 hours, after which the percentage germination was determined.

It was at

p_H	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
%	0	52	86	91	90	90

Uptake of anions. Another means of comparing anion and cation uptake was by a study of the kinetics of the process. This was attempted by the use of P^{32} , to which 10 mg. of ascospores per ml. were exposed for varying periods of time. The total phosphorus concentration in the incubation mixture was $0.25 \mu\text{g.}$ per ml., and the solution was at p_H 1.5. Incubation was carried

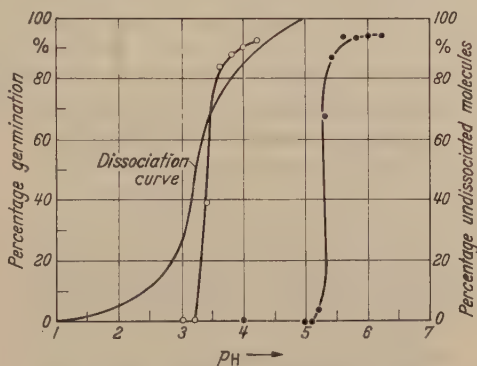


Fig. 1. Effect of p_H upon the toxicity of fluoride to ascospores of *N. tetrasperma*. The fluoride was added before activation. Results are given as the average of two determinations. Open circles: $1 \cdot 10^{-3}$ m; filled circles: $1 \cdot 10^{-2}$ m

Table 5. Influence of p_H on the toxicity of azide to dormant ascospores of *N. tetrasperma*

A final concentration of $1 \cdot 10^{-2}$ m azide was used with a spore suspension of 1 mg. per ml. Incubation in azide was continued for 30 minutes before the ascospores were washed and activated. The buffer concentration was 0.1 m except in the case of MacIlwain's buffer wherein $0.5 \cdot 10^{-2}$ m Na_2HPO_4 and $0.25 \cdot 10^{-2}$ m citrate were mixed. The germination of controls was unaffected by incubation in the buffers alone

p_H	Buffer	percentage germination	p_H	Buffer	percentage germination
1.0	HCl	0	3.0	MacIlwain's	0
2.0	phosphate	0	4.0	MacIlwain's	0
3.0	phosphate	0	4.5	MacIlwain's	22
4.0	phosphate	0	5.0	MacIlwain's	96
5.0	phosphate	95	6.0	MacIlwain's	96
6.0	phosphate	98			

out in 125 ml. Erlenmeyer flasks containing 20 ml. of spore suspension on a reciprocal shaking machine at 20° C. Aliquotes were withdrawn periodically and were plated and counted as described previously, with the results shown in Table 6. It seems reasonably certain that no significant uptake occurred under these conditions. This experiment was repeated at pH 2.0 and 6.0 with the same results.

Table 6. P^{32} uptake by dormant ascospores of *N. tetrasperma*

Ascospores (10 mg. per ml.) were incubated with 0.25 μ g. per ml. of phosphate solution at pH 1.5. Aliquots were removed at intervals, plated, and counted as described in the text. Results are the average of samples in triplicate except for the control which was run in sextuplicate

Time in phosphate	counts per minute	Time in phosphate	counts per minute
control (0 time)	3011 $\pm$ 74	3 hours	2938 $\pm$ 51
30 min	3047 $\pm$ 36	7 hours	2997 $\pm$ 87
60 min	2987 $\pm$ 79	11 hours	3036 $\pm$ 23
		24 hours	3005 $\pm$ 55

Fluoride uptake was also studied by mixing 20 ml. of a spore suspension containing 44 mg. of dormant ascospores per ml. with an equal volume of 60 μ g. of sodium fluoride per ml. dissolved in 0.1 n HCl. This suspension was incubated and shaken at 20° C. Aliquots were withdrawn at intervals,

and after centrifugation the supernatant fluid was recovered for analysis. The spores were washed in 4 changes of distilled water, and their germination rate was tested as before. Fig. 2 gives these results as well as those of experiments in which only half the amount of spores was used. In all cases, uptake continued for over 8 hours, although at a decreasing rate. Furthermore, none of the spores germinated after 10 hours of exposure to fluoride.

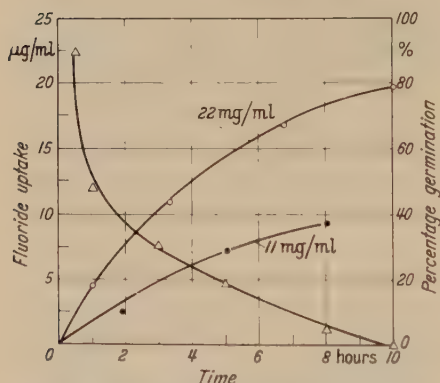


Fig. 2. Uptake of fluoride and its effect upon the germination of ascospores of *N. tetrasperma*. Germination results were obtained from an experiment utilizing 11 mg. of ascospores per ml.. Triangles: effect upon germination; circles: uptake of fluoride

gas exchange. For this purpose, heat-activated ascospores were incubated in $1 \cdot 10^{-2}$ m sodium azide (pH 5.2), and their oxygen uptake was compared with that of untreated spores suspended in water. The results as shown in Fig. 3 disclose that azide almost completely prevents the respiratory

Manometric studies. Information as to the rapidity with which toxic anions enter the cell was sought by means of studies of

increase attendant upon activation. Dormant cells were incubated in the same concentration of the poison and were washed in 3 changes of distilled water after 1 hour. The spores were activated as before, and their oxygen uptake was determined in the presence and absence of Ca^{++} . It can be seen in Fig. 4 that the effect is almost the same as when activated cells are incubated continuously in the poison. Furthermore, in contrast to the case of toxic cations (LOWRY et al. 1957), the effect of azide is not inhibited by Ca^{++} .

These results were substantiated by experiments with fluoroacetate; dormant ascospores were exposed to the poison for 2 and 24 hours. The residual fluoroacetate was removed, and the ascospores were heat-activated after resuspension in water. Respiratory determinations were made, with the results shown in Fig. 5. As in the case of cells treated with azide, those exposed to fluoroacetate for 24 hours showed no increase in oxygen uptake due to activation. Although a smaller effect was noted when the ascospores were exposed to the poison for 2 hours, the inhibition was marked and not reversed by Ca^{++} . It should be noted that

the percentage germination was lower in the presence of this cation than in its absence, despite the similarity in respiratory rate. No explanation can be furnished for this effect at present.

A series of furfural analogues have been studied for their effect upon the activation process (SUSSMAN 1953). One of the most toxic of these was 5-nitro-2-furfuryl methyl ether, whose effect upon the respiratory metabolism of ascospores was studied as above. As can be seen in Fig. 6, the inhibition of oxygen uptake does not occur until at least 60 minutes

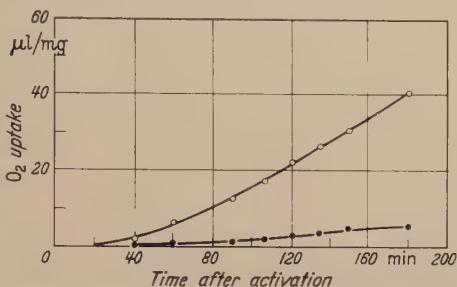


Fig. 3. Effect of sodium azide (pH 5.2) upon oxygen uptake when continually incubated with activated ascospores of *N. tetrasperma*. A final concentration of $1 \cdot 10^{-2}$ m sodium azide was used with about 4.0 mg. of spores per vessel. Points represent the average of 5 determinations. Open circles: control 92% germination; filled circles: treated, no germination

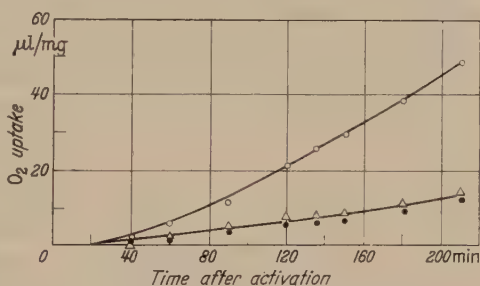


Fig. 4. Effect of sodium azide upon O_2 uptake when dormant ascospores (5.0 mg. per vessel) were exposed to $1 \cdot 10^{-2}$ m (in 0.1 n HCl) for 1 hour and then washed free of the poison and activated. Points represent the average of 5 determinations. Open circles: control, 87% germination; filled circles: treated, no germination; triangles: treated with $1 \cdot 10^{-2}$ m Ca^{++} , no germination

after activation, despite the fact that germination was sharply curtailed, as in the case of cells treated with azide or other acid poisons.

Since further work with intact ascospores required some knowledge of the effect of possible substrates, 0.11 m glucose was added, and the carbon

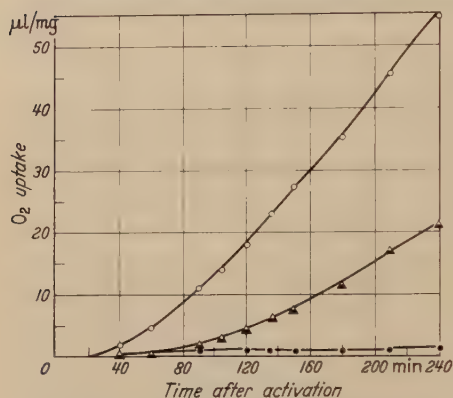


Fig. 5. Effect of sodium fluoroacetate upon O_2 uptake when dormant ascospores (4.5 mg. per vessel) were exposed to $1 \cdot 10^{-3}$ m (in 0.1 n HCl) for 2 and 24 hours and then washed free of the poison and activated. Points represent the average of duplicate vessels. Open circles: control, 91% germination; filled circles: treated 24 hours, no germination; open triangles: treated 2 hours, 24% germination; filled triangles: treated 2 hours plus $1 \cdot 10^{-3}$ m Ca^{++}

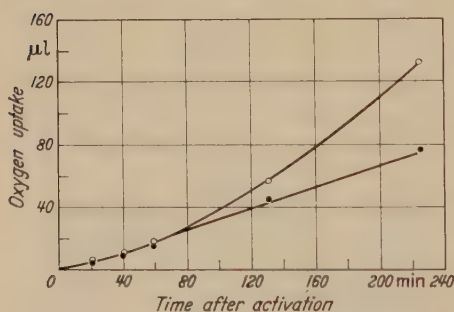


Fig. 6. Effect of 5-nitro-2-furfuryl methyl ether upon O_2 uptake when continually incubated with activated ascospores of *N. tetrasperma*. A final concentration of $1 \cdot 10^{-3}$ m of the poison was used with approximately 2.0 mg. of ascospores per vessel. Points represent the average of duplicate samples. Open circles: control, 90% germination; filled circles: treated, no germination

dioxide output and the oxygen uptake of activated ascospores were measured. The data in Fig. 7 demonstrate that there is no effect upon gas exchange until 140 minutes after activation. At this time the rate of both carbon dioxide evolution and oxygen uptake increased markedly, and because the respiratory quotient (R.Q.) was 1.0 it was assumed that the substrate was fully oxidized.

The gas exchange of dormant ascospores was the same in the presence and in the absence of the same amount of glucose.

It had been noted by GODDARD (1935) that anaerobically incubated ascospores evolved more CO_2 than dormant cells for about an hour after activation, but thereafter they evolved comparatively less. In order to discover whether this decline was due to lack of substrate, and to investigate whether exogenous glucose could be used anaerobically, the following experiment was performed. Ascospores were activated and immediately placed in Warburg vessels in an atmosphere of 95% nitrogen and 5% CO_2 . Thereupon, the amount of CO_2 evolved by cells in the presence and absence of 0.11 m glucose

was measured. The results are plotted in Fig. 8. No significant difference in either oxygen uptake or CO_2 output could be detected, and in no case did anaerobically incubated ascospores germinate.

Discussion

When dormant ascospores of *N. tetrasperma* are incubated in adequate concentrations of different acids, germination is prevented even if the spores are washed and incubated in distilled water. However, the concentration necessary to poison the dormant ascospores was usually 100-fold higher than when the activated cells were incubated continuously in the acid. Furthermore, dormant spores were resistant to an incubation in toxic compounds like propionate for 24 hours, whereas activated spores were completely poisoned within the time necessary for the protrusion of the germ tube (3 hours at 20° C). It was also found that dormant cells could be incubated in 0.05 n acid so that much higher concentrations of the undissociated molecule could be obtained than was possible for activated cells which were restricted to a pH range between 3.0 and 8.0.

That anionic substances penetrate more readily at an acid pH is amply demonstrated in Table 5 and Fig. 1. It would appear that the undissociated molecule must be in high concentration before fluoride (pK, 3.2) or azide (pK, 4.7) can penetrate the dormant cell. Similar results were obtained when fluoroacetate (pK, 2.7) was used with activated cells (Table 6).

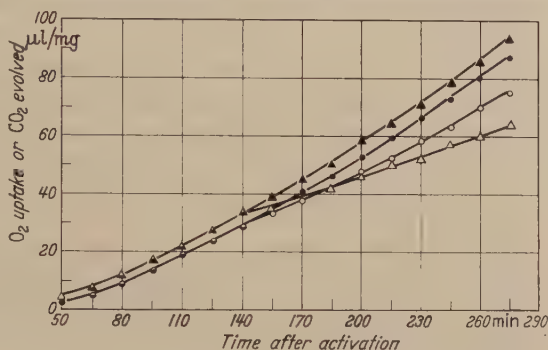


Fig. 7. The respiration of activated ascospores of *N. tetrasperma* in the presence and absence of glucose at a final concentration of 0.11 m. Each vessel contained 1.2 mg. of ascospores and each point represents the average of triplicate samples. Open circles: O₂ uptake of controls; filled circles: O₂ uptake in presence of glucose; open triangles: CO₂ evolution of controls; filled triangles: CO₂ evolution in presence of glucose

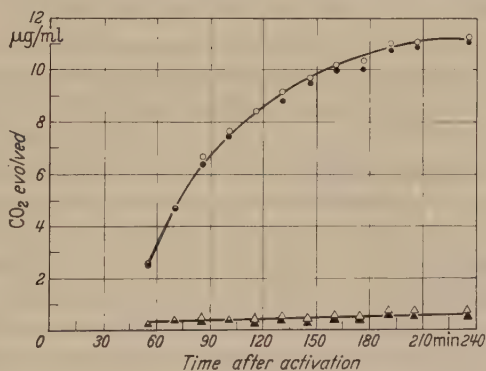


Fig. 8. Fermentative capacity of dormant and activated ascospores of *N. tetrasperma* in the presence and absence of glucose. Each vessel contained 9.2 mg. of dormant ascospores or 2.6 mg. of the activated ones. Each point represents the average of triplicate determination. Open circles: CO₂ evolution of activated spores in presence of glucose; filled circles: CO₂ evolution of activated spores in absence of glucose; open triangles: CO₂ evolution of dormant spores in presence of glucose; filled triangles: CO₂ evolution of dormant spores in absence of glucose

The curves in Fig. 1 are almost identical in shape with those found for the effect of fluoride on yeast respiration (SIMON and BEEVERS 1952). Although the resemblance between the dissociation curve and that for toxicity is close, their shapes are not identical; the latter can be displaced along the abscissa, depending upon the concentration of fluoride used. Several points of difference arise when these data on the penetration of anions are compared with the results of previous work with cations. These include the following:

1. All cations tested (LOWRY et al. 1957) were adsorbed to the surface of *Neurospora* ascospores. The kinetics of uptake resemble those of the Freundlich isotherm, and these substances could be eluted by the use of other cations.

By contrast, the uptake of anions is linear with time, and their toxic effect is not inhibited by other anions. PO_4^{3-} and probably other anions are not absorbed at all by dormant ascospores, whereas there was uptake of all cations tested.

2. The effect of cations upon the respiration of activated ascospores is never manifest until at least 90 minutes after activation (LOWRY et al. 1957). This was used as evidence of the possibility that these substances, although removed from the solution by the cells, do not penetrate to sensitive loci until just before germination.

The same results were obtained when activated ascospores were incubated with anions like fluoroacetate, cysteine (SUSSMAN et al. 1956) and 5-nitro-2-furfuryl methyl ether (Fig. 6). However, when dormant cells were pre-treated with fluoroacetate for 24 hours, or with azide for 30 minutes, and then activated, very different results were obtained (Figs. 4 and 5). In these cases the rise in respiration associated with activation is obviously prevented from the start because these anions penetrate to sensitive sites almost at once. The data in Fig. 3 which were obtained when azide was added to activated cells corroborate these findings. Moreover, the effect of fluoride parallels that of azide almost exactly (unpublished results). EMERSON (1954) has shown similar effects of azide upon ascospores of *N. crassa*, but for reasons as yet unexplained, furfural-activated spores were insensitive to this poison.

The conclusions drawn from these results are that acids of small size like hydrazoic and hydrofluoric penetrate the dormant and the activated ascospores with relative rapidity. On the other hand, larger ones like propionate, butyrate, cysteine, and phosphoric acids penetrate very slowly, or not at all. Fluoroacetate is intermediate in that it enters at a slow rate but rapidly enough to poison after 24 hours (Tables 2 and 4). Therefore, compounds which contain 2 carbon atoms approach the limit of size beyond which no penetration is effected, so that acetate and its

analogues penetrate slowly and poison after 24 hours but propionate and larger compounds are innocuous even after this time. The delayed effect of cysteine and fluoroacetate upon the respiration of activated ascospores (SUSSMAN et al. 1956) can be explained as being due to their failure to penetrate until just before germination. This vitiates the use of these data to prove that a qualitatively different type of metabolism arises at the time of germination, although independent evidence still favors this conclusion. That the interpretation offered above is consistent with data on the size of the anions concerned is suggested by the fact that MOELLER (1952) gives 1.01 Å as one dimension of the hydrazoic acid molecule which is of linear form. The other dimension is much longer (approx. 2.7 Å) but it is likely that the molecule can penetrate through its smaller dimension. On the other hand, $\text{PO}_4^{=}$ is of tetrahedral form and is much larger than either the azide molecule in one of its dimensions or than fluoride in all of its dimensions (MOELLER 1952). These considerations would, therefore, seem to substantiate the interpretation proposed above.

Summary

Acids like hydrogen fluoride, hydrazoic and fluoroacetic have been shown to prevent the germination of ascospores of *N. tetrasperma* when dormant spores are treated. On the other hand, propionate, cysteine and others are ineffective when used in this way. When activated ascospores were treated, much lower concentrations of the acids were sufficient to poison the spores. As in other systems, these substances are most effective at a pH below their pK_a .

The kinetics of uptake of fluoride by dormant ascospores were studied and shown to be very different from those reported for cations. However, P^{32} was not absorbed by dormant ascospores, even at pH 1.5.

Respiratory inhibition by azide and fluoroacetate occurred immediately after the spores were activated, but in the case of 5-nitro-2-furfuryl methyl ether no effect was observed until just before germination occurred.

These results suggest that a permeability barrier exists in the dormant ascospore which disappears upon germination. Moreover, the dormant spore seems to be permeable to acids of small size but impermeable to those possessing more than 3 methylene groups or of equivalent size.

Bibliography

- EMERSON, MARY R.: Plant Physiol. **29**, 418 (1954). — FISKE, G. H., and Y. SUBBAROW: The colorimetric determination of phosphorus. J. of Biol. Chem. **66**, 375—400 (1925). — GODDARD, D. R.: J. of Gen. Physiol. **19**, 45 (1935). — HUNTER, G. J., B. J. MACNULTY and E. A. TERRY: The determination of microgram quantities of fluoride. I. The use of the aluminum-haematoxylin complex.

Anal. Chim. Acta (Amsterd.) 8, 351—368 (1953). — LOWRY, R. J., A. S. SUSSMAN and BERTA VON BÖVENTER-HEIDENHAIN: Physiology of the cell surface of Neurospora ascospores. III. Distinction between the adsorptive and entrance phases of cation uptake. In Press. Mycologia (1957). — MOELLER, T.: Inorganic Chemistry. An advanced textbook. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1952. — SIMON, E. W., and H. BEEVERS: The effect of p_H on the biological activities of weak acids and bases. I. The most usual relationship between p_H and activity. New Phytologist 51, 163—190 (1952). — SUSSMAN, A. S.: J. of Gen. Microbiol. 8, 211 (1953). — SUSSMAN, A. S.: J. of Gen. Physiol. 38, 59 (1954). — SUSSMAN, A. S., J. R. DISTLER and J. KRAKOW: Metabolic aspects of Neurospora activation and germination. Plant Physiol. 31, 126—135 (1956). — UMBRETT, W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER: Manometric techniques and tissue metabolism. Minneapolis: Burgess Publ. Co. 1949.

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Bonn, Medizinisch-parasitologische Abteilung)

Enzymatischer Abbau der Membranen von *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont mit Lysozym

Von

GEORG WOLFGANG FUHS

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 25. September 1957)

Ein oft beschrittener Weg, gewisse Zelleinschlüsse für die chemische Analyse rein zu gewinnen, besteht in der mechanischen Zertrümmerung der Zellen und der anschließenden Suspension und fraktionierten Sedimentation des homogenisierten Materials. Man kann in gewissen Fällen schonender vorgehen, indem man die Zellmembranen enzymatisch abbaut. Für einige Bakterienarten wie z. B. *Micrococcus lysodeikticus* und *Bac. megaterium* erwies sich die Polysaccharase Lysozym als brauchbar (SALTON 1952, WELSHIMER 1953, WEIBULL 1953, 1956 u. a.). GUEX-HOLZER u. TOMCSIK (1956) analysierten die Zellwandsubstanz von „*Bacillus M*“ an Hydrolysaten, die mit Lysozym hergestellt worden waren.

Die *Oscillatorien* wurden von uns in der von FUHS (1958a, b) beschriebenen Weise kultiviert, sodann in m/150 Phosphatpuffer von pH 6,8 überführt, dem Lysozym (krist., aus Eiklar, von Worthington, Freehold N. J., U.S.A.) in Konzentrationen von 20, 200 und 2000 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt war. Die Algen hielten wir in diesen Lösungen bei Licht und 28°C. Zur Kontrolle beobachteten wir die Fäden in Phosphatpuffer ohne Enzym oder aber in destilliertem Wasser.

Unter dem Einfluß des Lysozym wurden die Längs- und Quermembranen von den Fadenenden und Fadenbruchstellen her abgebaut, während die Scheiden erhalten blieben. Die Zellen, deren Membranen gelöst waren, zeigten deutliche Autolyse. Die normalerweise hochviscosen Protoplasten quollen mehr oder weniger stark. Der Abbau war bei einer Enzymkonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ nach 24 Std 4—5, nach 48 Std 4—20 Zellen weit fortgeschritten, bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ 6 bzw. 12 bis 40 Zellen weit. Eine weitere Erhöhung der Konzentration um das Zehnfache förderte den Abbau nicht mehr wesentlich. In den Kontrollen, die im Phosphatpuffer aufbewahrt worden waren, war nach 24 Std die Farbe teilweise nach Gelbgrün verändert, nach 48 Std setzte in beiden

Kontrollen allmählich Autolyse ein. Die Abbildung zeigt Fäden nach einer 48stündigen Einwirkung von 2000 $\mu\text{g/ml}$ Lysozym.

Ähnliche Versuche mit Hyaluronidase verliefen ergebnislos.

Es ist demnach grundsätzlich möglich, mit diesem Verfahren *Oscillatorien* protoplasten und deren granuläre Einschlüsse zu isolieren. Ob unsere Beobachtungen auch Schlüsse auf die Chemie der *Oscillatorien*membranen zulassen, scheint uns dagegen noch ungewiß zu sein.

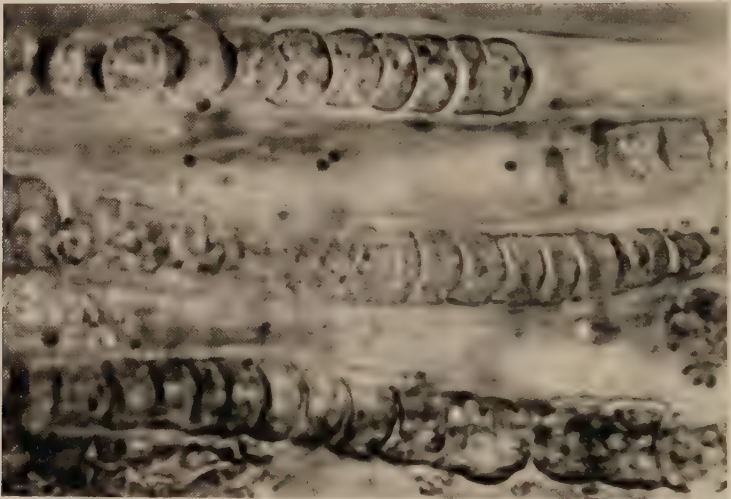


Abb. 1. *Oscillatoria amoena* nach Lysozymbehandlung (2000 $\mu\text{g/ml}$, 48 Std). Membranen abgebaut, Scheiden unversehrt. 2080:1

Literatur

- Fuhs, G. W.: Bau, Verhalten und Bedeutung der kernäquivalenten Strukturen bei *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gom. Arch. Mikrobiol. **28**, 270—302 (1958a). — Untersuchungen über granuläre Strukturen im Cytoplasma von *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gom. Österr. Bot. Z. 1958 (b) (im Druck). — GUEN-HOLZER, S., and J. TOMČÍK: The isolation and chemical nature of capsular and cell wall haptens in a *Bacillus* species J. Gen. Microbiol. **14**, 14 (1956). — SALTON, M. R. J.: Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. Nature (Lond.) **170**, 746 (1952). — WEIBULL, C.: The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. J. Bacter. **66**, 688 (1953). — Bacterial protoplasts; their formation and characteristics. Bacterial anatomy (Sixth Sympos. Soc. Gen. Microbiol., London 1956), pp. 111—126. Cambridge: Academic Press 1956. — WELSHMER, H. J.: The action of lysozyme on the cell wall and capsule of *Bacillus megaterium*. J. Bacter. **66**, 112 (1953).

(Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Institut für Medizin und Biologie, Berlin-Buch, Arbeitsbereich Biochemie)

Über die Ansäuerung der Nährflüssigkeit durch *Phycomyces blakesleeanus*

Von

E. GLADTKE und W. BRUCKER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Oktober 1957)

Die Aciditätserhöhung des Nährsubstrates durch höhere Pflanzen ist seit nahezu 190 Jahren (SIMON 1768) oft beobachtet und untersucht worden. Für die Erklärung standen sehr lange Zeit Wurzelausscheidungs- oder Austauschvorgänge im Vordergrund (BURGMANS 1786 bis LUNDEGÅRDH 1952). Erst 1956 konnte FUSS am Beispiel von *Lupinus luteus* endgültig die Ansäuerung des wurzelnahen Nährmediums als durch eine spezifische Kationenaufnahme bedingt erklären. Allerdings beschränkt sich seine Hypothese ausdrücklich auf zur Photosynthese befähigte grüne Organismen.

Bei früheren Untersuchungen zur Biogenese der Gallus- und Protocatechusäure durch den Pilz *Phycomyces blakesleeanus* (BRUCKER 1957 und früher) wurde ebenfalls eine Ansäuerung des Nährmediums im Laufe einer mehrwöchigen Kultur gemessen. Diese Tatsache schien uns einer Untersuchung wert. Es zeigte sich, daß eine p_H -Erniedrigung vom Ausgangswert p_H 5 bis annähernd zu p_H 3 auch hier im wesentlichen auf eine gesteigerte Kationenaufnahme zurückgeführt werden muß¹.

Methodik

Als Kulturflüssigkeit für unseren Pilzstamm XXXVII *Phycomyces blakesleeanus* H 102 (BURGEFF) diente die Nährlösung nach SCHOPFER (1935): 30 g Glucose, 2 g Glycin, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g KH_2PO_4 und 40 μg Aneurin je 1 l dest. Wasser. Kultiviert wurde in Erlenmeyer-Kolben (200 ml) mit je 50 ml Nährlösung bei $25 \pm 1^\circ C$. Um gleichzeitig den Einfluß der Belichtung studieren zu können, haben wir bei Dauerlicht, im Dauerdunkel und bei intermittierendem Licht (8 Std dunkel, 16 Std hell) mehrere Versuchsreihen verfolgt. Als Lichtquellen dienten Leuchtstoffröhren, HNW und HNG, mit einer Beleuchtungsstärke von etwa $10000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ an den Kulturgefäßen. Die Pilzgewichte wurden bestimmt nach Trocknung ($100^\circ C$) bis zur Gewichtskonstanz. Sie schwankten um $\pm 5\%$. Die p_H -Messungen erfolgten mit dem Philips-Universal- p_H -Meßgerät und der Glaselektrode. Fehler: 0,01 p_H -Einheiten. Die Meßproben wurden wie bei allen späteren Untersuchungen täglich entnommen.

¹ Die Nährlösung (s. unten) enthält kein physiologisch saures Ammonsalz.

Organische Säuren. Milchsäure haben wir nach der colorimetrischen Methode von KUBOWITZ (1952) bestimmt. Sie wird dabei durch konzentrierte H_2SO_4 bei 100°C zu Acetaldehyd abgebaut. Mit Veratrol tritt dann bei Gegenwart von Fe-III-Ionen eine grüne Färbung auf. Brenztraubensäure wurde fermentchemisch nach dem Prinzip von WARBURG (1948) bestimmt. Sie wird dabei von hydriertem Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) in neutralem oder schwach saurem Milieu bei Anwesenheit von Lactodehydrogenase stöchiometrisch zu Milchsäure hydriert. DPNH absorbiert im Gegensatz zu DPN bei $340\text{ m}\mu$. Die DPNH-Abnahme läßt sich im UV-Licht quantitativ verfolgen und gibt ein direktes Maß der Brenztraubensäuremenge. Citronensäure wurde nach NATELSON, PINCUS u. LUGOVOY (1948) mittels einer Pentabromacetonreaktion nachgewiesen. Oxalsäure haben wir manganometrisch zu bestimmen versucht.

Außerdem wurden die organischen Säuren papierchromatographisch weiterverfolgt. Die Keto-Säuren haben wir dazu in Dinitrophenylhydrazon überführt (LINSKENS 1955). 50 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 50 ml 2n HCl gelöst, 0,5 ml dieser Lösung mit 0,1 ml Nährlösung 30 min bei 25° behandelt, die klare Lösung aufgetragen und aufsteigend chromatographiert. (Schleicher-Schüll-Papier 2043 b; Laufmittel: wassergesättigtes n-Butanol; Nachweis im UV-Licht).

Ferner haben wir die Nährlösung unbehandelt oder nach Überführen aller Mineralsalze in Na-Salze mittels eines Na-gesättigten Kationenaustauschers (Wofatit-KPS-Säule) aufsteigend im Partridge-Gemisch chromatographiert und mit 0,04% iger Bromphenolblaulösung als Indicator besprüht.

Die Aminosäuren haben wir aufsteigend in Butanol : Eisessig : Wasser (4:1:5) chromatographiert. Angefärbt wurde mit 0,5% iger Ninhydrinlösung in 95% Butanol und 5% 2n Essigsäure oder Histidin und Tyrosin mit diazotierter Sulfanilsäure, wenn erforderlich Prolin und Oxyprolin mit Isatinlösung und Tryptophan mit Dimethylaminobenzaldehyd in 20% iger HCl.

Kationen. Die Kaliumbestimmungen erfolgten am Flammenphotometer nach der von der Herstellerfirma C. Zeiss, Jena, angegebenen Methode. Für unsere Untersuchung genügte eine Meßbreite von 50—500 $\mu\text{g/ml}$ K. Der Meßfehler betrug etwa 1%.

Nach Fällung einer Ca-Verunreinigung als Ca-Oxalat wurde aus dem Überstand das Magnesium als Mg-Ammoniumphosphat in ammoniakalischer Lösung gefällt, der Niederschlag in verdünntem NH_4OH gewaschen, in HCl aufgenommen und als Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat und Amidol colorimetrisch bestimmt. Fehlergrenze $\pm 3,5\%$.

Calcium wurde dem Nährmedium nach SCHOPFER nicht zugegeben. Es befand sich in einer geringen Menge als Verunreinigung in der Glucose. Der Gesamtgehalt bewegte sich an der unteren Empfindlichkeitsgrenze der flammenphotometrischen Bestimmungsmethode. Um den Ca-Stoffwechsel trotzdem verfolgen zu können, wurde dem Nährmedium eine trägerarme, unwägbare Menge ^{45}Ca (Halbwertszeit 164 Tage) zugesetzt. Die Messungen des Aktivitätsverlaufes erfolgten mit dem Endfensterzählrohr (Glimmerfolie $1,9\text{ mg/cm}^2$) und erstreckten sich über 30 Tage. Die Zählrohrausbeute betrug bei konstanten Geometrieverhältnissen (3 cm Objekt-Abstand) knapp 3% der theoretischen Zerfallsrate.

Anionen. Phosphat wurde in der Nährlösung mit Ammoniummolybdat und Amidol colorimetrisch bestimmt (BOSSE). Fehlergrenze $\pm 1\%$. Zum Studium der Ansäuerung des Nährmediums interessierte nur die ortho-Phosphorsäure. Deshalb wurde die Lösung zur Phosphatbestimmung im allgemeinen nicht hydrolysiert oder verascht. Zusätzliche vergleichende Untersuchungen haben wir jedoch nach feuchter Veraschung mit einem $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ -Perchlorsäure-Gemisch durchgeführt.

Sulfat wurde in bekannter Weise als Ba-Sulfat gefällt, mit dem Filterstäbchen nach EMICH (Schott, Jena, G4) abgesaugt und gravimetrisch bestimmt. Fehlergrenze etwa $\pm 4\%$.

Zu Vergleichsbestimmungen wurde das Pilzmycel bei 100°C 24 Std lang vortrocknet und dann zur Mg-, K- und P-Ermittlung im Muffelofen bei 400°C trocken und anschließend mit einem $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ -Perchlorsäure-Gemisch feucht verascht. Zur S-Bestimmung wurde nach WAELSCH u. KLEPETAR mit einem Veraschungsgemisch aus 25 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 10 g NH_4NO_3 und 25 g NaCl in 100 ml Wasser, das mit gesättigter Sodalösung bis zur Lackmus-alkalischen Reaktion versetzt war, aller Schwefel zu Sulfat oxydiert und dann in üblicher Weise als Ba-Salz gravimetrisch bestimmt.

Ergebnisse

Das Trockengewicht der Pilze steigt nach dem Auskeimen der Sporen bis etwa zum 4. Tage langsam und dann mehr oder weniger steil an. Nach dem Erreichen des Maximums am 8.—12. Tage bleibt es abgesehen von den individuellen Schwankungen der einzelnen Kulturen ungefähr bis zum 15. Tag auf gleicher Höhe. Dann nehmen die Gewichte leicht ab. Der Verlauf der Gewichtskurven entspricht grundsätzlich den Angaben von SCHOPFER (1939). Die Unterschiede der Kulturen im Dauerlicht,

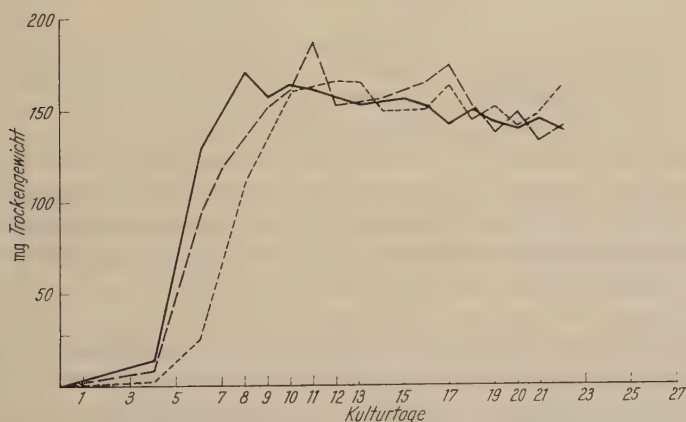


Abb. 1. Trockengewichtskurven von *Phycomyces*.

Kultur im Dauerlicht — — — — —
Kultur im Dauerdunkel —————
Kultur im Licht-Dunkel-Wechsel - · - · - ·

Dauerdunkel und intermittierenden Licht sind unter unseren Bedingungen unerheblich und nicht signifikant. Der Zeitpunkt, an dem die Höchstgewichte gemessen werden, liegt für den hier geschilderten Versuchsansatz bei den Dunkelkulturen zufällig 3—4 Tage vor den unter Belichtung gewachsenen Pilzen. Dieser Befund war nicht reproduzierbar. Andere Versuchsreihen verhielten sich anders, zum Teil sogar umgekehrt. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 zusammengefaßt.

Der pH -Wert fällt vom Ausgangswert bei pH 5 ebenfalls erst langsam, dann steiler ab und erreicht etwa zwischen dem 8. und 13. Tag den niedrigsten Wert. Der Zeitpunkt der höchsten Acidität stimmt bei den Pilzen mit gleichen Kulturbedingungen fast völlig mit dem Erreichen des Höchstgewichtes überein. Vom 15. Tag an beginnen die pH -Werte entsprechend der Trockengewichtsabnahme langsam wieder anzusteigen (Abb. 2).

Milchsäure konnte nur in geringen Mengen nachgewiesen werden, die an der unteren Erfassungsgrenze der Methode lagen. Am 10. Kulturtage, dem mittleren Maximum der Acidität, fanden sich etwa $2 \mu g$ Milchsäure

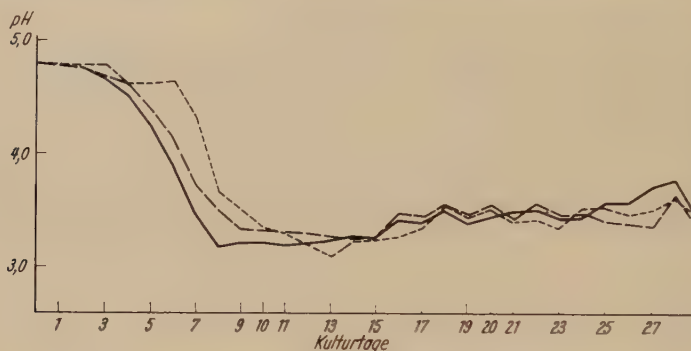


Abb. 2. pH -Veränderungskurven des Nährmediums. Kurven wie in Abb. 1

im Milliliter Nährlösung oder eine $0,2 \cdot 10^{-4}$ molare Konzentration. 1 ml Lösung enthielt weiterhin $6,6 \mu g$ Brenztraubensäure, das entspricht einer $0,8 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung. Oxalsäure ließ sich manganometrisch nicht in nachweisbaren Mengen auffinden. An Citronensäure wurden Werte um $15 \mu g$ je Milliliter, bzw. $0,8 \cdot 10^{-4}$ mol ermittelt, die ebenfalls an der unteren Grenze der Bestimmbarkeit lagen.

Infolge des von 5 auf 3 abgesunkenen pH -Wertes treten offenbar Autolyseerscheinungen auf, wie es die papierchromatographische Analyse der Aminosäureausscheidung ergab. Frühere Untersuchungen des einen von uns (BRUCKER 1957) haben gezeigt, daß von der dem Nährmedium zugegebenen N-Menge (Mikro-Kjeldahl-Methode) nach 12tägiger Kultur noch annähernd $\frac{2}{3}$ vorhanden ist. Jedoch ergaben die Chromatogramme der Ninhydrin-positiven Substanzen ein Spektrum von 12 Streifen, die im wesentlichen den Aminosäuren (von oben nach unten): Tyrosin, Alanin, Glutaminsäure, Serin, Glycin, Asparaginsäure, Asparagin, Lysin, Glutathion, neben anderen, nicht analysierten Stoffen zugeordnet werden konnten. Wir haben darauf die Aminosäureausscheidung der Pilze vom 2. Tage der Kultur an mit 2 Tagen Abstand chromatographisch verfolgt. Vom 6. Tage an werden unter unseren methodischen Bedingungen neben dem zugegebenen Glycin im Nährmedium andere, ausgeschiedene Amino-

säuren in geringen Mengen nachweisbar. Die Hauptmenge läßt sich jedoch in steigendem Maße vom 8. Kulturtag an auffinden. Die Aminosäureausscheidung ist eine Folge der Aciditätserhöhung. Kulturversuche über CaCO_3 (Bodenkörper) als Puffersubstanz führten bei gleicher Kulturdauer zur Verdoppelung der Pilzgewichte. Aminosäuren wurden dann nicht ausgeschieden. Permeabilitätsveränderungen waren — wie aus gleichzeitigen quantitativen Phenolbestimmungen ersichtlich — für das Ergebnis nicht

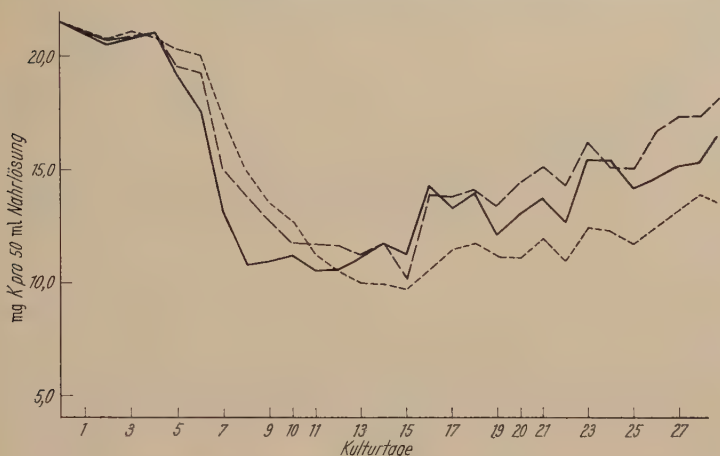


Abb. 3. K-Gehalt des Nährmediums vom 1.—28. Kulturtag. Kurven wie in Abb. 1

verantwortlich. Eine kausale Beteiligung der Aminosäuren an der Aciditätserniedrigung bis zum 8. Tag besteht demnach nicht. Daneben wird von den Pilzen nach dem 12.—15. Kulturtag Ammoniak ausgeschieden, das im Medium als Ammoniumsalz vorliegt (Bestimmungsmethode nach CONVAY).

Alle Versuche, weitere organische Säuren papierchromatographisch nachzuweisen, mißlangen selbst nach 10—100facher Konzentrierung durch Einengen und mehrfaches Auftragen der Ausgangslösung. Schon BERNHARD u. ALBRECHT (1947) haben keine Keto-Säuren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin aus der Nährlösung des *Phycomyces* isolieren können. Auch ließ sich Citronensäure von ihnen nach der Methode von STAHR nicht nachweisen. Die von uns während des pH-Abfalles gefundenen, relativ geringen Mengen organischer Säuren genügen bei weitem nicht, die beschriebene Säuerung zu erklären.

Da der Nährlösung nur KH_2PO_4 und MgSO_4 als anorganische Salze zugesetzt sind, konnten wir uns auf die Bestimmung dieser 2 Ionenpaare beschränken. Dazu kommt eine geringe Menge Ca, die aus der Glucose als Verunreinigung stammt. Der K-Gehalt der Lösung nimmt wiederum erst langsam, dann vom 4. Tag an stärker bis etwa zum 8.—13. Tag

entsprechend der Pilzgewichtszunahme und parallel zur p_H -Kurve ab. Vom 15. Tag an steigt der K-Gehalt des Mediums wieder an. Die Angaben (Abb. 3) beziehen sich auf Milligramm K je Kolben (50 ml Nährlösung) und sind Mittelwerte aus je zwei parallelen Kulturen. Die Abnahme des K-Gehaltes in der Lösung beläuft sich maximal von 21,6 mg auf 9,6 mg, d. h. auf 44,5%. Die nach Belichtung oder Verdunklung auftretenden Differenzen des K-Gehaltes im Nährmedium entsprechen völlig den Ge-

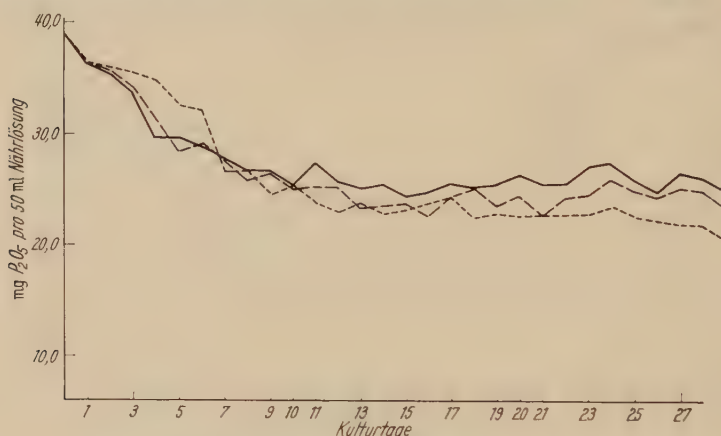


Abb. 4. Phosphat-Gehalt des Nährmediums (ausgedrückt als P_2O_5). Kurven wie in Abb. 1

wichts- und p_H -Unterschieden, sind aber gleich diesen und allen folgenden entsprechenden Ergebnissen an den Mg-, H_2PO_4 - und SO_4 -Ionen nicht signifikant für die Kulturbedingungen.

Der Phosphat-Gehalt der Nährlösung (Abb. 4) nimmt von Anfang an mehr oder weniger steil ab und erreicht das Minimum etwa am 13. Tag. Ein Wiederanstieg der ortho-Phosphorsäure im Medium bis zum 27. Tag wurde nicht beobachtet. Die Werte sind ebenfalls Mittelwerte aus zwei parallelen Kulturen. Die Angabe erfolgt in P_2O_5 . Die Abnahme verläuft maximal von 39 mg auf 23,3 mg/50 ml Nährlösung, d. h. um 43 %. Am 10. Tag (mittleres p_H -Minimum) liegt der Wert bei 25 mg oder 64 % des Ausgangswertes. Die Mg- und Sulfat-Bestimmungen ergeben etwa ähnliche Verhältnisse. Mg hat das Minimum am 12.—13. Tag erreicht und dabei vom Ausgangswert um 45 % abgenommen (Abb. 5). Auch die Sulfat-Abnahme verläuft bis zum 12. Tag und erreicht dann etwa 67 % des Ausgangswertes (Abb. 6).

Im ganzen verlaufen alle beschriebenen Kurven besonders bis zum 13. Tag annähernd parallel. Gewicht, Aufnahme der Ionen durch den Pilz und Säuerung der Nährlösung nehmen etwa bis zum 13. Tag zu, um dann zu stagnieren oder wieder abzunehmen.

Als Kausalfaktor für die p_H -Verschiebung im Schopfer-Nährmedium spielt der Ca-Stoffwechsel des *Phycomyces* sicher keine erhebliche Rolle. Der Vollständigkeit halber haben wir auch die Ca-Aufnahme durch den Pilz gemessen. Die im Kulturmedium vorhandene Ca-Menge beträgt nicht mehr als etwa $5 \mu\text{g/ml}$ Nährflüssigkeit. Wir haben daher dem Medium 2 mC

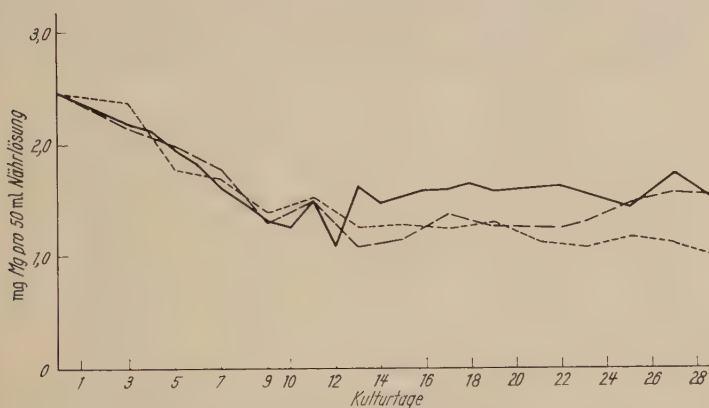


Abb. 5. Mg-Gehalt des Nährmediums. Kurven wie in Abb. 1

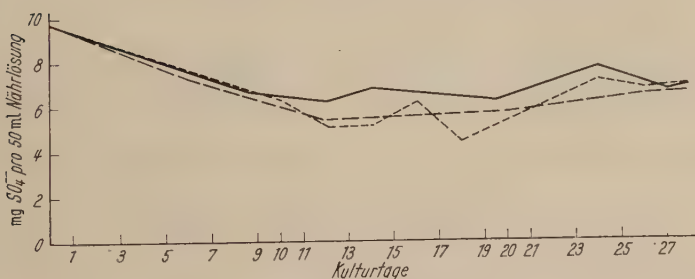


Abb. 6. Sulfat-Gehalt der Nährlösung vom 1.—28. Kulturtage. Kurven wie in Abb. 1

^{45}Ca zugegeben und den Aktivitätsabfall verfolgt, der durch die Ca-Aufnahme durch den Pilz hervorgerufen wurde. Die Daten sind aus der Tab. 1 zu entnehmen. Die Aufnahme des radioaktiven Calciums stagniert ebenfalls am 12. Tag. An den folgenden Tagen wird gleich den meisten geprüften Stoffen in der Nährlösung eine Zunahme des Calciums gemessen.

Aufschluß über die Ursache der p_H -Änderung ergeben Ionenbilanzen. Im gebrauchten Kulturmedium befindet sich gegenüber den mineralischen Kationen ein Überschuß an Anionen, dem ein Überschuß an H-Ionen entspricht. Bei einer Untersuchung fanden wir z. B. einen H-Ionen-Überschuß in der Konzentration von $33,2 \cdot 10^{-4}$ molar (Tab. 2).

Die Ergebnisse der Elektrotitration der Nährlösung sind in der folgenden Kurve (Abb. 7) zusammengestellt. Durch einen Zusatz von HCl bis zur Endkonzentration von $33,2 \cdot 10^{-4}$ mol ergibt sich danach auf der Kurve ein p_H -Wert um 3,1, wie er auch im Nährmedium gemessen wurde.

Tabelle 1. ^{45}Ca -Aktivitätsveränderung bzw. Ca-Abnahme in der Nährlösung

Kultur- tage	i.p.m. ¹ Tausend	Prozent der Aus- gangslösung	vorhandenes Ca in $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	Ca-Abnahme $\mu\text{g}/100\text{ ml}$
0	56,4	100,0	500	0
2	56,4	100,0	500	0
4	56,2	99,7	499	1
6	56,1	99,5	497	3
8	56,1	99,5	497	3
10	53,4	94,7	473	27
12	53,0	93,7	468	32
14	53,0	93,7	468	32
16	53,5	94,5	470	30
25	54,5	96,5	483	17

¹ i.p.m. = Impulse/Minute.

Da die Pufferung der Nährlösung zwischen p_H 5 und 3, wie die Kurve zeigt, gering ist, ergeben kleine Änderungen der Säurekonzentration recht große p_H -Verschiebungen. Deshalb war zu erwarten, daß die ermittelten und errechneten Werte nicht immer so gut übereinstimmen. Es läßt sich jedoch immer zur Erklärung der p_H -Verschiebung ein annähernd ausreichender Säureüberschuß messen. Der überwiegende Teil (etwa 95%)

Tabelle 2. Ionenäquivalente in einer frischen Nährlösung und nach 10 Kulturtagen

	Frische Nährlösung, p_H 4,82		Nährlösung am 10. Tag, p_H 3,16	
	Anionen	Kationen	Anionen	Kationen
Mg ⁺⁺	40,6 · 10 ⁻⁴	40,6 · 10 ⁻⁴	29,0 · 10 ⁻⁴	21,4 · 10 ⁻⁴
SO ₄ ⁻⁻		110,0 · 10 ⁻⁴		55,8 · 10 ⁻⁴
K ⁺	110,0 · 10 ⁻⁴	110,0 · 10 ⁻⁴	79,6 · 10 ⁻⁴	
H ₂ PO ₄ ⁻			0,2 · 10 ⁻⁴	
Milchsäure			0,8 · 10 ⁻⁴	
Brenztraubensäure . .	150,6 · 10 ⁻⁴	150,6 · 10 ⁻⁴	0,8 · 10 ⁻⁴	
Citronensäure				
Summe	150,6 · 10 ⁻⁴	150,6 · 10 ⁻⁴	110,4 · 10 ⁻⁴	77,2 · 10 ⁻⁴
Überschuß an H ⁺ . .		± 0		33,2 · 10 ⁻⁴
(Angaben in Äquival.)				

(Angaben in Äquival.)

der Säuerung ist also nach unseren Ergebnissen durch eine vermehrte Kationenaufnahme bedingt. Den größten Anteil an der Ursache der p_H -Abnahme hat die relativ starke K-Aufnahme durch den Pilz.

Zur Kontrolle wurden noch Bilanzuntersuchungen zwischen der gebrauchten Nährlösung und der Pilzasche angestellt. Die Menge der in

der Asche der Pilzthalli gefundenen Salze entspricht ungefähr (Fehlmenge: 4—5,6%) dem Salzverlust der Nährlösung nach 10tägiger Kulturdauer. Die Werte sind in der Tab. 3 zusammengestellt. Der Wiederanstieg der p_H -Werte nach dem 8. bzw. 13. Tag ist auf die Wiederabgabe der Mineralien an das Nährmedium zurückzuführen. Allerdings müßte diese Alkalitätserhöhung der K-Kurve entsprechend wesentlich stärker ausgeprägt sein. Auch die Ammoniakausscheidung wirkt aciditätserniedrigend. Die p_H -Erhöhung wird aber durch die einsetzende,

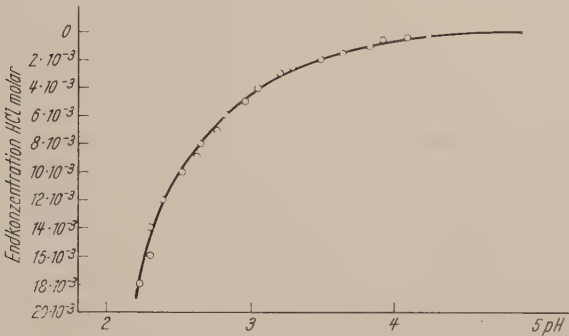


Abb. 7. Elektrotitrationskurve der Schopfer-Nährlösung zwischen p_H 4,8 und 2,2

autolytische Aminosäureausscheidung teilweise kompensiert. Auch die Wiederabgabe der aufgenommenen Mineralien durch den Pilz ist wahrscheinlich keine aktive Ausscheidung, sondern wird durch die p_H -bedingten Autolysevorgänge hervorgerufen.

Tabelle 3. Vergleich der in der Nährlösung am 10. Tag verbliebenen und von den Pilzen aufgenommenen Ionenmengen

	Frische Nährlösung	Nährlösung am 10. Tag	Asche	Fehlmenge
K ⁺	21,6 mg	14,5 mg	5,9 mg	1,2 mg = 5,6%
Mg ⁺⁺	2,5 mg	1,3 mg	1,1 mg	0,1 mg = 4,0%
P ₂ O ₅	39,0 mg	26,8 mg + 5% = 1,3 mg (kond. Phosph.)	9,0 mg	1,9 mg = 4,9%
SO ₄ —	9,7 mg	5,3 mg	3,9 mg	0,5 mg = 5%

In einem Nährsubstrat von p_H 3—3,5 keimen die Pilzsporen nicht oder nur sehr schlecht aus. Bringt man einen 10—12 Tage alten Pilz in frisches Nährmedium aber von p_H 3—3,5, so ist an den folgenden Tagen keine Gewichtsvermehrung zu messen. Der Pilz verhält sich wie in einer gebrauchten Nährlösung. Auf einer gepufferten Nährlösung dagegen wächst der Pilz weit über den 12. Tag hinaus (s. S. 57). Der begrenzende Faktor für die Stoffaufnahme und das Wachstum des *Phycomyces* in der

Schopfer-Lösung ist daher nicht der Mangel an irgendeinem Nähr- oder Wirkstoff, sondern die durch die gesteigerte Kationen-Aufnahme aus dem Nährmedium bedingte p_H -Erniedrigung.

Diskussion der Ergebnisse

Eine selektive Kationenaufnahme, wie sie in unserem beschriebenen Falle vorliegt, kann nach der Ionenaustausch-Theorie von LUNDEGÅRDH (1952) durch die Abgabe von H-Ionen durch die Organismen ermöglicht werden. Die dadurch entstehenden freien, anorganischen Säuren führen, wie sich nachweisen ließ, zu der entsprechenden p_H -Veränderung. Für den Aufschluß und die Ausnutzung relativ schwerlöslicher Minerale bei der Wurzeltätigkeit höherer Pflanzen ist diese Tatsache von größter Bedeutung. Für den auf Schopfer-Medium kultivierten Pilz aber bedeutet sie ein frühzeitiges Einsetzen von Autolyseprozessen. Ein gut gepuffertes Nährmedium dagegen führt zu einer wesentlich besseren Ausnutzung der gebotenen Nährstoffe und läßt den Pilz in 12 Tagen ein fast doppelt so großes Gewicht erreichen. Der p_H -Ausgangswert der nur schwach gepufferten Schopfer-Lösung dürfte durch das zugegebene KH_2PO_4 bestimmt, der erreichte Endwert durch die im Medium vorhandene Glycinmenge wesentlich beeinflußt sein. BERNHARD u. ALBRECHT fanden 1947 ein erhebliches Ansteigen der H-Ionenkonzentration der Nährlösung nach 10—12 tägiger Kultur von *Phycomyces*-Stämmen. Sie konnten im Extrem einen p_H -Abfall vom Ausgangswert 4,8—5,1 bis zu p_H 2,3 messen. In diesem Falle benutzten sie an Stelle des von uns als N-Quelle verwandten Glycins die Ammoniumsalze der Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Weinsäure neben einem reichlichen Glucose-Angebot als C-Quelle. Die im Schopfer-Medium durch den Glycin-Zusatz erfolgte Pufferung etwa ab p_H 3,5 entfällt durch die benutzten Salze. So kann die Acidität bis zu den genannten Werten ansteigen.

Die verstärkte K-Aufnahme trug unter unseren Bedingungen den Hauptanteil an der H-Ionenvermehrung. Ältere bereits auf LIEBIG zurückzuführende Untersuchungen von SCHMALFUSS (1936), SCHMIDT (1936) u. a. zeigten die Sonderstellung des Kaliums für die Ernährung höherer Pflanzen. FUSS (1956) führt die periodische Schwankung der Aciditätsänderung der Kulturlösung von *Lupinus luteus* auf die von den Belichtungs- und Verdunklungs-Perioden abhängige Photosynthese und die damit in Zusammenhang stehende K-Aufnahme zurück. Eine verstärkte K-Aufnahme fand unter seinen Bedingungen nur während der Belichtungsperiode statt. Bei dem heterotrophen *Phycomyces* ließ sich ein Einfluß des Lichtes auf die K-Aufnahme nicht nachweisen. Eine etwaige, wesentliche Kausalität der dissimilatorischen CO_2 -Produktion für die p_H -Erniedrigung entfällt in unserem Beispiel aus naheliegender Überlegung (p_H 3!).

Neben einer Ansäuerung des Nährmediums von Pilzen durch die verstärkte Bildung organischer Säuren — etwa denen des Citronensäurecyclus oder der Oxalsäure durch *Aspergillus niger* — muß daher, wie in unserem Falle, auch die Möglichkeit einer Aciditätserhöhung durch eine selektive Kationenaufnahme in Erwägung gezogen werden.

Zusammenfassung

1. Der *Phycomyces-blakesleeanus*-Stamm XXXVII H 102 (BURGEFF) säuert, auf einer Nährlösung nach SCHOPFER kultiviert, sein Nährmedium vom Ausgangs- p_H bei 5,0 bis etwa p_H 3 an. Der niedrigste Wert ist nach 8—12 Tagen erreicht. Dann steigt der p_H -Wert langsam wieder an und erreicht am 25.—30. Tag ungefähr p_H 3,6—4,0.

2. Quantitative Bestimmungen eventuell gebildeter Citronensäure, Brenztraubensäure, Oxalsäure und Milchsäure ergaben lediglich Minimalwerte. Die entstandenen Säuren betragen nur rund 5% der zur Erklärung der Aciditätserhöhung notwendigen Menge. Papierchromatographisch ließen sich auch nach erheblicher Konzentrierung der Ausgangslösung keine weiteren, organischen Säuren außer durch Autolyse abgegebenen Aminosäuren nachweisen. Die Aminosäuren traten aber erst nach dem Erreichen der niedrigsten p_H -Werte der Kulturlösung in dieser auf.

3. Die Aufnahme der im Nährmedium vorhandenen Ionenpaare K^+ , $H_2PO_4^-$ und Mg^{++} , SO_4^{--} durch den Pilz wurde quantitativ verfolgt. Sie beträgt unter den gegebenen Bedingungen am 10. Tag für $K^+ = 54 \cdot 10^{-4}$, $H_2PO_4^- = 30 \cdot 10^{-4}$, $Mg^{++} = 19 \cdot 10^{-4}$ und $SO_4^{--} = 11 \cdot 10^{-4}$ Äquivalente. Der Kurvenverlauf der Abnahme der einzelnen Stoffe entspricht im Prinzip der p_H -Abfallskurve.

4. Das als Verunreinigung der Glucose gefundene Calcium spielt mengenmäßig für die Aciditätsänderung keine Rolle.

5. Ionenbilanzen ergeben zum Zeitpunkt des niedrigsten p_H -Wertes einen Anionenüberschuß von $33,2 \cdot 10^{-4}$ molar. In einer Elektrotitrationskurve der Nährlösung entspricht dieser Wert dem theoretischen und tatsächlich gefundenen p_H -Wert von etwa 3,1.

6. Der Aschegehalt der Pilzthalli entspricht ungefähr dem Salzverlust in der Nährlösung.

7. Die Wiederabnahme der H-Ionenkonzentration nach dem 12. Kulturtag ist mit einsetzenden Autolysevorgängen (Aminosäureausscheidung, Ammoniakbildung) und der wahrscheinlich passiven Rückgabe der Nährsalze an das Medium verbunden.

8. Die Aciditätsänderung des Kulturmediums durch *Phycomyces blakesleeanus* ist daher im wesentlichen (zu 95%) auf eine selektive und verstärkte Kationen- besonders K-Ionen-Aufnahme zurückzuführen.

Herrn Prof. Dr. Dr. K. LOHMANN danken wir für sein kritisches Interesse am Fortschreiten der Untersuchung. Frl. M.-L. JÜRGES hat in dankenswerter Weise assistiert.

Literatur

BERNHARD, K., u. H. ALBRECHT: Helvet. chim. Acta **30**, 627 (1947). — BOSSE, R.: zit. nach LOHMANN, K., u. P. LANGEN: Biochem. Z. **328**, 1 (1956). — BRUCKER, W.: Habilitationsschrift, Humboldt-Universität, Berlin 1957. — Arch. Mikrobiol. **26**, 302 (1957).

FUSS, K.: Flora (Jena) **144**, 1 (1956).

KUBOWITZ, F.: Z. inn. Med. **7**, 865 (1952).

LINSKENS, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Springer 1955. — LUNDEGÅRDH, H.: Nature (Lond.) **169**, 1088 (1952).

NATELSON, S., J. B. PINCUS and J. K. LUGOVOY: J. of Biol. Chem. **175**, 745 (1948).

SCHMALFUSS, K.: Naturwiss. u. Landw. **19** (1936). — SCHMIDT, O.: Z. Bot. **30**, 289 (1936). — SCHOPFER, W. H.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **4**, 67 (1935). — Erg. Biol. **16**, 1 (1939). — SIMON, S. (1768): zit. nach F. CZAPEK: Biochem. d. Pflanzen II, 526 (1920).

WAELSCH, H., u. G. KLEPETAR: Z. physik. Chem. **211**, 47 (1932). — WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente. Berlin 1948.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin)

Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hefezelle*

Von

MARLEEN KÄRBER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. Oktober 1957)

In zahlreichen Arbeiten der letzten Jahre wird versucht, die Cytologie der enzymatisch so gut untersuchten Hefen zu klären. Obwohl dieser Versuch mit den verschiedensten Methoden unternommen worden ist, steht eine endgültige Klärung noch aus.

Im Rahmen dieser Arbeit interessierten besonders die „Granula“ der Hefezellen, über deren Struktur und Funktion bis heute noch eine völlige Unklarheit herrscht. Es liegt auch keine Einigung darüber vor, ob wir es nur mit einem Granulotyp zu tun haben oder mit mehreren. Folgende Literaturübersicht unter besonderer Berücksichtigung von Arbeiten aus den letzten 10 Jahren soll dies belegen.

Im normalen Hellfeldmikroskop fallen stark lichtbrechende Granula auf, die nicht selten besonders um die Vacuole herum lokalisiert sind. Bereits MACALLUM (1899) stellte fest, daß mit dem Einsetzen einer Gärung diese Granula ihren Charakter und auch ihre Zahl ändern. Zu Beginn der Gärung sollen sie mehr Fettcharakter, später mehr Proteidcharakter besitzen. Nach WAGER u. PENISTON (1910) können die lichtbrechenden Granula je nach dem physiologischen Zustand der Hefezellen entstehen und verschwinden. Es soll sich um Fett- und Volutintropfen handeln. Außerdem unterscheiden die Autoren auch noch Chromatingranula, die aber erst nach Fixierung und Färbung sichtbar werden. SCHULTZE (1910) beobachtet schon die Speicherung von Indophenol in den „Tröpfchen“ bei der Nadi-Reaktion, eine Erscheinung, die später für die Charakterisierung der Granula von Bedeutung wurde. Mit Hilfe der Fixierungsmethode von REGAUD weisen JANSSENS u. HELSMORTEL (1912) Chondriosomen (zur Terminologie vgl. KÜSTER 1956, S. 394; DEROBERTIS 1955, S. 114; DRAWERT 1953, S. 136; STEFFEN 1955) in den Hefezellen nach. Außerdem sollen auch noch andere Granula vorkommen. Ein einwandfreier Nachweis von Chondriosomen, und zwar meist fadenförmigen Chondriokonten, gelingt dann GUILLIERMOND (1923) durch die Vitalfärbung mit Janusgrün B und Dahliaviolett. Die um die Vacuole lokalisierten Granula sollen Lipotide enthalten, so daß er sie als „granulations lipodiques“ von den Chondriosomen unterscheidet (GUILLIERMOND 1932). In seinem zusammenfassenden Überblick spricht HENRICI (1941) von Volutingranula.

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin, 1957.

Wie GUILLIERMOND beschreibt auch MEISSEL (1938a, b) die sich mit Janusgrün vital färbenden stäbchen- und fadenförmigen Chondriosomen. Er erwähnt aber nichts von anderen granulären Einschlüssen des Cytoplasmas, mit Ausnahme von Vacuolen in unmittelbarer Nähe der Chondriosomen, deren Inhalt sich wie diese, aber schwächer, mit Janusgrün färbt. Von besonderem Interesse ist der Gestaltswechsel der Chondriosomen, der nach MEISSEL bei einer Änderung des Verhältnisses von Atmung und Gärung bei *Saccharomyces ludwigii* auftritt. Bei guten Atmungsbedingungen durchsetzen zahlreiche fädige Chondriokonten das Cytoplasma. Mit Einsatz der Gärung verschmelzen die Chondriokonten allmählich zu einigen großen hypertrophierten Chondriosomen, die an die Peripherie der Zellen wandern und große Stränge bilden. Allerdings sollen nicht alle Zellen diese morphologischen Änderungen zeigen.

Aus vielen färbungsanalytischen Untersuchungen geht ohne Zweifel hervor, daß die stark lichtbrechenden, im Phasenkontrast tief dunkel erscheinenden Granula sehr lipoidreich sein müssen — zumindest in bestimmten physiologischen Zuständen der Hefe. So färben sich die Granula mit Sudan und fluorescieren nach GRAFFI (1941) intensiv mit dem stark lipophilen Benzpyren. Wachsende Hefezellen besitzen mehr und meist auch kleinere Granula, die häufig zu größeren Klumpen zusammengeballt sind. Da bei Protisten und tierischen Geweben die Benzpyren speichernden Strukturen sich auch mit Janusgrün B vital färben lassen, werden sie für Mitochondrien gehalten (GRAFFI u. MAAS 1940, GRAFFI 1940, vgl. auch GEISSLER 1955) und sollen in der Hefe nicht mit den Volutinkörnchen von A. MEYER identisch sein (GRAFFI u. Mitarb. 1953).

Während GRAFFI also nur eine Granulaart, und zwar Mitochondrien, für Hefe beschreibt, unterscheidet BRANDT (1942) auf Grund einer Vitalfärbung mit Janusgrün B und von UV-Absorptionsmessungen wieder zwei unterschiedliche Einschlüsse des Cytoplasmas. Neben den mit Janusgrün vital färbbaren und kaum UV absorbierenden Chondriosomen an der Peripherie der Zelle zeichnen sich die vor allem in der Nähe des Vacuolenrandes liegenden Volutinkörnchen durch eine sehr starke UV-Absorption aus, sind also reich an Ribosenucleotiden. Sie können zu Gruppen zusammentreten und sich bei einsetzendem Wachstum unter Verquellung auflösen. Jetzt weist das vorher nur sehr schwach absorbierende Cytoplasma eine starke UV-Absorption auf (CASPERSSON 1941, 1950, und CASPERSSON u. BRANDT 1941). LIETZ (1951) bezeichnet die Volutingranula direkt als extranucleäre Nucleoli.

Zunächst nennt auch LINDEGREN die stark lichtbrechenden Granula „fat granules“, 1948 identifizierte er sie aber wie GRAFFI u. Mitarb. mit den Mitochondrien (LINDEGREN 1949). In Übereinstimmung mit den Angaben von CASPERSSON u. BRANDT für die RNShaltigen Volutinkörnchen schreibt LINDEGREN, daß die „Mitochondrien“ nur in ruhenden Zellen gut zu sehen sind. Mit Beginn der Zellteilung sollen sie sich auflösen, so daß das Plasma optisch homogen erscheint. Die Grundlage der Mitochondrien soll nach LINDEGREN (1952) RNS sein, außerdem zeichnen sie sich durch einen wechselnden Fettgehalt aus, der in ruhenden Zellen am höchsten ist.

Die Auffassung von GRAFFI und von LINDEGREN setzt sich zunächst durch. Neben der Janusgrün B-Färbung sollen vor allem auch die Färbung mit Indophenolblau bei der Nadi-Reaktion, mit Formazan bei der TTC-Behandlung, die vitale Fluorochromierung mit Berberinsulfat, die Mitochondriennatur der Granula beweisen. So sprechen SARACHEK u. TOWNSEND (1953) von Mitochondrien und betonen deren ausgeprägte Fähigkeit zur UV-Absorption. (Man vergleiche dazu aber die oben erwähnten Angaben von BRANDT 1942.) VON MUNDKUR (1953), KRIEG (1954), GEISSLER (1955), HARTMAN u. LIU (1954) sowie NAGAI (1955) werden die Granula als Mitochondrien aufgefaßt. ROLL (1955) spricht bei ihren Zentrifugierungsver-

suchen mit Hefe-Homogenat allerdings vorsichtiger von „Mitochondrien“. BAUTZ u. MARQUARDT (1953a, b) prägen zunächst zurückhaltender den Begriff „Granula (Grana) mit Mitochondrienfunktion“; später sprechen sie aber auch einfach von Mitochondrien (BAUTZ u. MARQUARDT 1954, MARQUARDT u. BAUTZ 1954, BAUTZ 1954). Ferner nehmen sie eine Korrelation zwischen Mitochondrienzahl und Zellgröße an, während nach MUNDKUR (1953) keine solche Beziehung bestehen soll. Elektronenmikroskopisch sind nach BARTHOLOMEW u. LEVIN (1955) Granula verschiedener Dichte darstellbar, es ist aber nach den Autoren nicht möglich, die erhaltenen Bilder als Mitochondrien zu identifizieren.

Ganz abgesehen von der sehr klaren und überzeugenden Darstellung der Unterschiede zwischen den lichtbrechenden Granula und den Chondriosomen durch GUILLIERMOND mußten gegen die Gleichsetzung beider Strukturen Bedenken aufkommen, als DRAWERT (1955) zeigen konnte, daß ein Aminopyren, das bei der Hefe sich so verhält wie Benzpyren (vgl. GRAFFI 1941), in den Oberepidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa* nicht die Chondriosomen, sondern die Sphärosomen fluorchromiert. Ebenso verhält sich Nilblau (DRAWERT 1952). Ferner ließ sich an Hefezellen zeigen, daß mit Berberinsulfat zwei Granulatypen nachweisbar sind, die sich so verhalten wie die Chondriosomen, bzw. die Sphärosomen von *Allium*-Zellen gegenüber dem Alkaloid (DRAWERT u. KÄRBER 1956). GUTZ (1956) konnte bei seinen Untersuchungen an *Mucor racemosus* zu keiner klaren Zuordnung der Granula in den Hyphen dieses Pilzes zu den Chondriosomen oder den Sphärosomen kommen, so daß er die Vermutung ausspricht, daß es sich bei den „Chondriosomen“ und „Granula“ von *Mucor racemosus* möglicherweise um verschiedene Zustandsformen ein und desselben Zellorganells handelt. Aus diesem Grunde begann ich mit einer eingehenden Analyse des Verhaltens der Hefegranula gegenüber Vitalfarbstoffen.

Inzwischen sind aber auch von anderer Seite Bedenken gegen die Gleichsetzung der lichtbrechenden Granula mit Mitochondrien erhoben worden. So änderten zunächst MARQUARDT u. BAUTZ ihre Auffassung, indem BAUTZ (1955a) bei Hefen 2 „Sorten“ von Mitochondrien, runde und stäbchenförmige, unterscheidet. Entsprechende Beobachtungen macht BAUTZ (1955b, c, 1956) auch an weiteren höheren Pilzen und nennt die beiden „Sorten“ jetzt im Anschluß an die Verhältnisse bei höheren Pflanzen (siehe PERNER 1953, DRAWERT 1953) „Mitochondrien“ und „Sphärosomen“. Ganz klar unterscheidet dann YOTSUYANAGI (1955) zwei Arten von Plasmaeinschlüssen bei der Hefe. Die lichtbrechenden Granula sollen sich nicht mit Janusgrün B, aber mit Sudan III und Formazan färben. Für die Chondriosomen ist dagegen die Vitalfärbbarkeit mit Janusgrün B und in fixierten Zellen die Färbung nach der Altmann-Methode charakteristisch. Ihre Gestalt hängt weitgehend vom physiologischen Zustand der Hefe ab. EPHRUSSI u. SLONIMSKI (1955) betonen, daß nur Gebilde, die sich entsprechend den Angaben von YOTSUYANAGI mit Janusgrün B und nach der Altmann-Methode färben lassen, als Mitochondrien (Chondriosomen) bezeichnet werden sollten. Mit diesen Methoden kann man sie unzweideutig von den lichtbrechenden Granula unterscheiden (EPHRUSSI, SLONIMSKI, YOTSUYANAGI u. TAVLITZKI 1956). Indophenolblau ist kein Reagens auf Mitochondrien. Die auf einem Mißverständnis beruhenden Einwände von WILLIAMS, LINDGREN u. YUASA (1956) können leicht widerlegt werden (EPHRUSSI, SLONIMSKI u. YOTSUYANAGI 1956). In jüngster Zeit gelang es dann auch AGAR u. DOUGLAS (1957), elektronenmikroskopisch zwei Granulatypen nachzuweisen, und zwar unstrukturierte sehr dichte Granula und eine lamelläre Struktur aufweisende Granula, die sich im peripheren Plasma befinden. Der letzte Typ wird als Mitochondrien gedeutet.

Auch über die Bildung bzw. Vermehrung der fraglichen Strukturen herrscht noch nicht volle Klarheit. Eine Reduplikation der lichtbrechenden Granula ist zwar von

verschiedenen Seiten angenommen, bisher aber noch nie beobachtet worden. Ihr völliges Verschwinden wird von einigen Autoren angegeben. MÜLLER (1956b) beschreibt „de-novo“-Entstehung von Hefegranula (= „Mitochondrien“), und EPHRUSSI et al. (1956) halten eine Neubildung des Chondrioms von einer färbbaren „perinucleären Zone“ aus für möglich. FREY-WYSSLING (1955) wirft die Frage auf, ob sich die sichtbaren Mitochondrien nicht vielleicht aus sublichtmikroskopischen, nucleinsäurehaltigen Promitochondrien entwickeln könnten (weitere Literatur siehe STEFFEN 1955). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Auffindung von Mitochondrien-Vorstufen („Promitochondrien“) in Paramaecien durch WOHLFAHRTH-BOTTERMANN (1957).

In der vorliegenden Arbeit sollte durch vergleichende Lebendbeobachtungen im Phasenkontrastmikroskop und Vitalfärbungen versucht werden, folgende Fragen zu klären: 1. lassen sich in Hefezellen immer beide Granulatypen nachweisen; 2. kann eine Gruppe auch fadenförmige Gestalt annehmen; 3. handelt es sich um Gebilde, die mit den Chondriosomen bzw. den Sphärosomen der höheren Pflanzen identisch sind, oder liegen nur verschiedene Zustandsformen ein und desselben Zellorganells vor?

Für die Vitalfärbungen wurden folgende Farbstoffe verwendet: Diazingrün (= Janusgrün B) Merck, Berberinsulfat neutral (Merck), Nilblau (Merck), Neutralrot (Bayer), Rhodamin B (Merck). Der Fettfarbstoff Sudanschwarz B (Merck) wurde in alkoholischer Lösung angewendet.

Janusgrün wird seit MICHAELIS (1900) zur elektiven Chondriosomenfärbung benutzt (GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1939; SOROKIN 1938, 1941; DRAWERT 1953; speziell für Pilze vgl. GUILLIERMOND 1923, zus.fassend 1941; TARWIDOWA 1938; HARTMAN u. LIU 1954; BAUTZ 1955 a, b, c und GUTZ 1956). Die durch Reduktion entstehende fluoreszierende Leukoform wird nach DRAWERT (1953) von den *Allium*-Oberepidermiszellen in den Sphärosomen gespeichert.

Berberinsulfat wird ebenfalls von den Chondriosomen der *Allium*-Oberepidermis aufgenommen, wo es sich fluoreszenzoptisch nachweisen läßt. Bei Sauerstoffmangel und unter der Einwirkung der Bestrahlung verblaßt die Chondriosomenfluoreszenz aber in kurzer Zeit und die Sphärosomen beginnen intensiv zu fluoreszieren. Wahrscheinlich wird die (sekundäre) Sphärosomenfluoreszenz durch eine veränderte Form (Reduktionsform?) des Berberinsulfats bewirkt (DRAWERT 1953).

Nilblau färbt vor allem die Vacuolen lebender Zellen (GUILLIERMOND 1922, GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1938, BUCHY 1941, DRAWERT 1940, 1952, 1953). Außerdem werden die Sphärosomen (= Mikrosomen) von *Allium*-Oberepidermiszellen (DRAWERT 1952, 1953) und die Granula von *Mucor racemosus* fluorochromiert. Das in den handelsüblichen Farbstoffpräparaten enthaltene Nilrot bewirkt eine sauerstoffunabhängige Fluorochromierung von Lipiden. Reines Nilblau fluorochromiert lipide Strukturen nur in reduziertem Zustand bei Abwesenheit von Sauerstoff (GUTZ 1956).

Zur Anfärbung der lipoiden Zellbestandteile wird von STRUGGER (1938, 1939) das Rhodamin B empfohlen. JOHANNES (1942) erhält mit Rhodamin B eine Hellfeldfärbung der Chondriosomen von *Saprolegnia*. Das Fluoreszenzbild ließ sich nicht eindeutig analysieren, da außer den Chondriosomen auch Fettröpfchen den Farbstoff gespeichert hatten. YAMAHA (1938) kann jedoch bei der Zwiebelsschuppenepidermis keine Chondriosomenfärbung nach Rhodamin B-Behandlung feststellen. DRAWERT (1953) beobachtet an demselben Objekt nur ausnahmsweise eine Chondriosomenfluoreszenz. Auch GUTZ (1956) erzielt mit Rhodamin B bei *Mucor racemosus* nur eine diffuse Cytoplasmafluoreszenz.

Sudanschwarz B wird von HARTMAN u. LIU (1954) zur Färbung der Granula von Hefe verwendet.

Die Versuche wurden mit folgenden Hefe-Stämmen durchgeführt: 1. Stamm *S*, Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae* (Hochschulbrauerei, Berlin), 2. Stamm *YF*, Amerikan. Bäckerhefe, *S. cerevisiae* (EPHRUSSI, Paris)¹, 3. Stamm *YFA*, atmungsgehemmte Mutante von *YF* (desgl.)¹, 4. Stamm *A 12*, *Saccharomycodes ludwigii* (Pflanzenphys. Inst. Berlin-Dahlem); ferner in einem Teil der Versuche 5. *Klöckera apiculata* (Inst. f. Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena)¹.

Als Nährmedien dienten ungehopfte Bierwürze, 12% ig (Hochschulbrauerei, Berlin) mit Leitungswasser 1 : 1 verdünnt (pH 5,8) und „Milieu 3 S“ (nach EPHRUSSI) mit folgender Zusammensetzung: Yeast Extract DIFCO 10,0 g; Glucose, C₆H₁₂O₆ · H₂O (Merck) 54,0 g; KH₂PO₄ (Merck) 1,0 g; (NH₄)₂SO₄ pro anal. (Kahlbaum) 1,2 g; aqua dest. ad 1000 ml (pH 6,1).

Zur Herstellung fester Nährböden wurden die Würze bzw. das „Milieu 3 S“ mit 2% Agar (Merck) versehen.

In Atmungsmessungen mit der Warburg-Apparatur konnte der geringe O₂-Verbrauch des Stammes *YFA* (SLONIMSKY 1949) bestätigt werden, wie Tab. 1 belegt.

Tabelle 1. O₂-Verbrauch von 2,0 ml gleichdichter Hefe-Suspensionen in µl/Std

Stamm <i>YF</i>		Stamm <i>YFA</i>	
75,44 Mittelwert		15,78 Mittelwert	
91,20	80,25	14,15	16,26
74,10		18,86	

A. Hauptteil

I. Deckglaskulturen

Deckglaskulturen für die Lebendbeobachtung mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden nach der Methode der Angleichung der Brechungsindices von Medium und Objekt (R. MÜLLER 1956a) angelegt. Die Nährgelatine setzte sich zusammen aus weißer gepulverter Gelatine (Merck) und 12% iger ungehopfter Würze, mit Leitungswasser oder aqua dest. 1 : 1 verdünnt. Die Gelatinekonzentration betrug 45%.

1. Herstellung des Gelatinefilms

Die Nährgelatine wurde in einem Erlenmeyer-Kölbchen auf dem Wasserbad verflüssigt, die Objektträger in heißem aqua dest. erwärmt und kurz zwischen Filtrierpapier getrocknet. Mit einem erwärmten Glasstab brachte ich einen Tropfen Nährgelatine an den Rand des erwärmten Objektträgers und strich ihn schnell mit einer warmen Rasierklinge dünn aus. Auf den entstandenen dünnen Film wurden mit einer Impfnadel mehrere Tröpfchen einer Hefeaufschwemmung gesetzt, dann bedeckte ich mit einem Deckglas, saugte die überschüssige Flüssigkeit am Rande mit Filtrierpapier ab und umrandete zum Schutz gegen Austrocknung mit Vaseline. Überstehende Gelatineränder entfernte ich vorher behutsam mit einer Rasierklinge.

2. Deckglaskultur mit Hefestamm *S*

24 Std alte, bei Zimmertemperatur gewachsene Hefe aus Schrägagar-Röhrchen (Würze-Agar) wurde in Würze (12% ig, mit Leitungswasser 1 : 1 verdünnt) aufgeschwemmt und auf einen Objektträger mit Nährgelatine geimpft.

¹ Für die Überlassung der Stämme *YF* und *YFA* möchten wir auch an dieser Stelle Herrn Prof. EPHRUSSI, Paris, und für die *Klöckera apiculata* Herrn Dr. R. MÜLLER, Jena, vielmals danken.

a) Analyse im Phasenkontrastmikroskop

Die im Hellfeld lichtbrechenden Granula erschienen im Phasenkontrast schwarz. In ruhenden Zellen lag die Mehrzahl der Granula kranzförmig um die Vacuole angeordnet. Bei einsetzendem Wachstum wurden die Granula im Cytoplasma verteilt. Ihre Verteilung bei der Zellsprossung schien zufällig zu sein. Die Vacuole sandte während der Zellteilung mehrmals einen züngelnden Fortsatz nach der Knospe hin aus, von dem kleine Anteile dabei getrennt und an die junge Zelle abgegeben wurden. Im Laufe des weiteren Wachstums vereinigten sie sich wieder zu einer Vacuole. Der Kern teilte sich erst gegen Ende der Knospung. Vorher war er nur undeutlich erkennbar. War die Zahl der Granula im Laufe der Zellteilungen auf ein Minimum (4—6 Granula je Zelle) gesunken, so schien eine Neubildung in folgender Weise vor sich zu gehen:

In unmittelbarer Nähe des Zellkernes wurde ein im Phasenkontrast dunkelgrauer, nicht scharf umgrenzter größerer „Körper“ sichtbar, der im Hellfeld nicht zu erkennen war. Er hatte rundliche bis ovale Gestalt und war etwas kleiner als der Zellkern. Von ihm lösten sich winzige, dunkelgraue Granula ab. Diese wurden vor allem an der Peripherie der Zelle sichtbar. Sie vergrößerten sich allmählich und erschienen dabei im Phasenkontrast immer dunkler und schärfer. Nach etwa 2 Std hatten sie die Größe und das Aussehen der übrigen Granula erreicht. Der dunkelgraue „Körper“ wurde bei der Granulaneubildung aufgebraucht.

Diese Art der Granulaneubildung konnte sowohl in Einzelzellen als auch während der Knospung beobachtet werden. Hierbei wurde der dunkelgraue „Körper“ zusammen mit dem Kern an Mutter- und Tochterzelle verteilt. Bei erneuter Knospung gelangten sowohl neu gebildete, kleine dunkelgraue, als auch im Phasenkontrast schwarz erscheinende Granula in die junge Zelle.

Während der 6—9stündigen ununterbrochenen Beobachtung der Deckglaskulturen unter dem Phasenkontrastmikroskop konnte nie ein Verschmelzen von Granula festgestellt werden. Bisweilen lagerten sich 2, 3 und 4 Granula enger zusammen. Sie blieben aber immer als Einzelgranula zu erkennen und trennten sich wieder bei einsetzender Zellsprossung und Granulaverteilung. Ebenso konnte während des angegebenen Zeitraumes nie eine völlige Auflösung einzelner Granula beobachtet werden. In einigen Zellen vorkommende besonders große Granula schienen während der anhaltenden Sprossung etwas kleiner zu werden. Ihre Verteilung bei der Knospung erfolgte wie die der anderen Granula.

Entsprechende Beobachtungen gelangen bei Deckglaskulturen von *YF*, *Klöckera apiculata* und *Saccharomyces ludwigii*. Bei *S. ludwigii* trat der dunkelgraue „Körper“ besonders deutlich hervor. Aber auch hier war er nicht im Hellfeld sichtbar.

II. Kultur und Vitalfärbung einzelner isolierter Zellen

Zur Prüfung, ob die im Phasenkontrast schwarz erscheinenden Granula und der dunkelgraue „Körper“ mit Diazingrün vital anfärbbar sind, wurden 24 Std alte, bei Zimmertemperatur gewachsene Kulturen von *S* und *YF* aus Schrägagar-Röhrchen verwendet.

Die Zellen wurden in 12% iger steriler ungehopfter Würze aufgeschwemmt und mit einer sterilen kleinen Glasfaden-Öse auf Deckgläser ausgestrichen, die vorher entsprechend dem auf S. 69 geschilderten Verfahren mit einem Gelatinefilm versehen waren.

Die Mikroösen wurden in Anlehnung an PETERFI (1932) mit dem Mikrokauder hergestellt. Dabei ist zu beachten, daß die Öse genau in einer Ebene liegt und daß das Ösenende angeschmolzen wird, da sich sonst die Öse beim Benetzen auseinander biegt, was die Bildung eines Flüssigkeitshäutchens verhindert. Als sehr zweckmäßig erwies sich auch die Ausspannung einer feinsten Kollodiummembran über der fertigen Öse.

Zur Schaffung einer feuchten Kammer kam zwischen Deckglas und Objektträger ein unter sterilen Bedingungen passend zugeschnittenes Fensterchen aus Filtrierpapier. Hierfür empfehlen sich die besonders dünnen Filter von Schl. u. Sch. Nr. 575. Zum Schutz gegen Austrocknung wurden die Objektträger in sterile Petrischalen übertragen, die mit feuchtem Filtrierpapier ausgelegt waren.

Um einzelne Hefezellen zu isolieren, wurde ein in der oben beschriebenen Weise beimpftes Deckglas mit Vaseline auf der oberen Öffnung der feuchten Kammer des Gleitmikromanipulators von Carl Zeiss, Jena, befestigt, die Öse in die Kammer eingeführt und von unten an das Deckglas herangebracht. Unter Beobachtung mit der Ölimmersion isolierte ich eine passend erscheinende einzelne Hefezelle mit der Öse und übertrug sie auf ein rasch ausgewechseltes, mit Gelatinefilm und Würze versehenes Deckglas. Das spätere Wiederauffinden der isolierten Hefezelle wurde dadurch erleichtert, daß ich zwei der Zelle gegenüberliegende, meist charakteristisch gezackte Randstellen des Gelatinefilms vermerkte. Die Deckgläser mit den isolierten Hefezellen kamen dann auf Objektträger mit feuchtem Filtrierpapierfenster und in die feuchten Petrischalen. Nach 3stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 28° C fingen die Zellen an zu knospen.

Im Phasenkontrast sind jetzt die schwarz erscheinenden Granula, die Vacuolen und in Teilung befindliche Kerne gut zu erkennen. Nach drei aufeinanderfolgenden Zellgenerationen ist die Granulazahl meist so weit gesunken, daß in günstig gelagerten Zellen bzw. Zellverbänden ein übersichtliches cytologisches Bild entsteht. Beim Stamm *YF* sind die Zellen etwas kleiner und die schwarz erscheinenden Granula nicht in so verschiedenen optischen Ebenen gelagert wie bei dem Stamm *S*.

Nachdem die Granulazahl und etwaige morphologische Besonderheiten (Form, Größe der Zelle und der Vacuole, eventuell Zahl der Vacuolen, Knospennarben) einer bestimmten Zelle notiert waren, erfolgte eine Vitalfärbung mit Diazingrün 1:20000 in einer 1% igen Lösung von Glucose (Merck) in Leitungswasser. Zur Sauerstoffsättigung leitete ich vorher $\frac{1}{2}$ Std lang Preßluft durch die Lösung. Ein Tröpfchen der Farblösung wurde mit einer Glascapillare in die Mitte eines feuchten Filtrierpapierfensters auf einen Objektträger gebracht. Auf dieses Farbtröpfchen kam das Deckglas mit der vorher ausgewählten Zelle. Bei einiger Übung findet man die Zelle mit einem schwachen Objektiv innerhalb kürzester Zeit (1— $1\frac{1}{2}$ min). Die Beobachtung erfolgte mit einer Zeiss Ölimmersion Apo 90.

Eine Färbung der Granula trat 2 min nach Zugabe der Farbstofflösung ein. Sowohl bei Zellen des Stammes *S* als auch bei *YF* stimmte bei wiederholten Versuchen die *Anzahl der im Phako schwarz erscheinenden Granula mit der Anzahl der mit Diazingrün gefärbten Granula überein*. Bei *S* konnte die Blaufärbung eines im Phasenkontrast dunkelgrau erscheinenden größeren „Körpers“ in einer einzelnen Zelle und während der Verteilung mit dem Kern bei einer knospenden Zelle beobachtet werden. Die Granula und die blau gefärbten größeren Gebilde waren spätestens 6 min nach Zugabe des Farbstoffes entfärbt. Die Entfärbung erfolgte plötzlich.

III. Färbungen mit verschiedenen Farbstoffen unter variierten Bedingungen und gleichzeitige Analyse mit dem Phasenkontrastmikroskop

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einer Kohlebogenlampe unter Zwischenschaltung der beiden Erregerfilter BG 12, 2 und 3 mm zur Erzeugung von Blaulicht und unter Benutzung des Ocularsperrfilters OG 5.

1. Hefe von *Schrägagar-Röhrchen*

a) *Hefestamm S*

Bei einem Teil der Zellen befanden sich stärker lichtbrechende Granula vor allem an der Grenze Vacuole/Cytoplasma, bei anderen Zellen waren sie aber auch im Cytoplasma verstreut. Im Phako war außer der Vacuole und den schwarz erscheinenden Granula in mehreren Zellen, meist in Kernnähe, ein dunkelgrauer „Körper“ deutlich zu erkennen.

Färbung mit Diazingrün

Der Farbstoff wurde in einer Konzentration 1:20000 in Leitungswasser mit und ohne Zusatz von 1% Glucose angewendet. Die Hefe wurde in der Farblösung aufgeschwemmt. Die Beobachtung im Hellfeld erfolgte mit einer Leitz-Wasserimmersion (90fache Vergrößerung). Das Objektiv tauchte unmittelbar in die Farbstofflösung. Eine blaue Granulafärbung trat nach einer Färbedauer von 2½ bis 3 min auf.

Die blaugefärbten Granula lagen zum Teil an der Grenze Vacuole/Cytoplasma, zum Teil im Cytoplasma verstreut. In einigen Zellen färbten sich außerdem winzige Granula an der Cytoplasmaperipherie. 4 min nach der Farbstoffzugabe ging die Blaufärbung der größeren Granula in einen blau- bis lilaroten Ton über. Die winzigen Granula an der Cytoplasmaperipherie entfärbten sich plötzlich. Nach 5 min färbte sich das Cytoplasma rosa bei gleichzeitiger Entfärbung aller Granula. Nach 10 min Färbedauer erschien das Cytoplasma farblos. Jetzt zeigte aber die Vacuole eine schwache rötliche Tönung. Auch bläulich-rote Vacuolenfärbungen beobachtete ich gelegentlich. In einigen Zellen konnte die Anfärbung eines kurzen oder längeren Fadens festgestellt werden. Wie bei den Granula trat Entfärbung ein. Die fädigen Gebilde verkürzten und verdickten sich zum Teil unter der Einwirkung des Farbstoffes, ehe sie sich

entfärbten. Zum Teil beobachtete ich außer einer blauen Granulafärbung eine diffuse schwach bläuliche Tönung des Cytoplasmas. Die Entfärbung konnte auch in der Weise erfolgen, daß das Cytoplasma bereits rosa gefärbt war, die Granula jedoch noch einen blau-violetten Ton beibehielten und erst allmählich abblaßten.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung wurde mit Deckglasabschluß gearbeitet. Die Färbedauer bis zum Deckglasabschluß betrug $2\frac{1}{2}$ —3 min. Die Präparate wurden mit Vaseline umrandet.

Nach 10 min Deckglasabschluß war nur eine orange Cytoplasmafluoreszenz zu sehen. Sie verstärkte sich bei Bestrahlung zu Goldgelb und überstrahlte auch zum Teil die allmählich auftretende goldgelbe Granulafluoreszenz. Nach 15 min Deckglasabschluß traten in dem rötlich-orange fluoreszierenden Cytoplasma einiger Zellen sofort bei Einschalten des Erregerlichtes schwach gelblich fluoreszierende Granula hervor.

Bis zur Dauer von 1 Std Deckglasabschluß gelangten alle 5 min Präparate zur fluoreszenzoptischen Untersuchung. Außer Zellen mit rötlich-orange fluoreszierendem Cytoplasma und schwacher gelblicher Granulafluoreszenz traten auch Zellen mit schwacher gelblich-oranger oder gelblich-weißer Cytoplasmafluoreszenz auf. Nach 1 Std Deckglasabschluß zeigten einige Zellen schwache gelblich-orange, andere schwache rötlich-orange Cytoplasmafluoreszenz. Im letzteren Fall verstärkte sich diese bei Bestrahlung mit Blaulicht zu Goldgelb, im ersten Fall trat eine sehr schwache, gelblich-weiße Granulafluoreszenz ein. Nach 2 Std Deckglasabschluß war eine orange Cytoplasmafluoreszenz zu sehen, die unter Blaulicht verstärkt wurde. Unter den Bedingungen des 2stündigen Deckglasabschlusses wurde nur bei wenigen Zellen durch Bestrahlung eine Granulafluoreszenz hervorgerufen. Nach 3stündigem Deckglasabschluß zeigten alle Zellen schwache orange Cytoplasmafluoreszenz, die sich bei Bestrahlung etwas verstärkte. Granulafluoreszenz war auch nach längerer Bestrahlung nicht zu beobachten. Im Hellfeld erschienen jetzt alle Zellen farblos. Nach 14stündigem Deckglasabschluß zeigten die meisten Zellen eine schwache gelbliche Cytoplasmafluoreszenz, jedoch keine Granulafluoreszenz. Die durch Bestrahlung hervorgerufene Granulafluoreszenz blieb auch nach 2tägigem Deckglasabschluß erhalten. Eine Eigenfluoreszenz ungefärbter Hefezellen war nicht zu beobachten.

Färbung mit Berberinsulfat

Angewendet wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 1:10000 in Leitungswasser. Eine Stammlösung 1:1000 in aqua dest. diente als Ausgangslösung. Die Hefe wurde in der Farblösung aufgeschwemmt. Die Färbezeit bis zur Bedeckung mit einem Deckglas betrug 4— $4\frac{1}{2}$ min.

Sofort nach Deckglasabschluß und Einschalten des Erregerlichtes war außer einer schwachen, weißlich-gelben Cytoplasmafluoreszenz eine schwache gelbliche Granulafluoreszenz zu beobachten. Diese erlosch jedoch unter der Strahlenwirkung innerhalb von 15 sec (siehe DRAWERT u. KÄRBER 1956). Das Cytoplasma begann jetzt intensiv gelb zu fluoreszieren. Wurden die Präparate nach Deckglasabschluß mit Vaseline umrandet, so konnte nach $\frac{1}{2}$ -, 1- und 2stündigem Deckglasabschluß eine Granulafluoreszenz festgestellt werden, die im Gegensatz zu der vorher

beschriebenen unter dem Einfluß der Bestrahlung nicht verschwand. In einzelnen Zellen trat eine Granulafluoreszenz erst bei Bestrahlung auf. Das Cytoplasma zeigte nur eine schwache weißlich-gelbe Fluoreszenz, die bei Bestrahlung unbeeinflußt blieb. In einigen Zellen konnte sofort nach Deckglasabschluß auch ein größerer „Körper“ oder ein längerer Faden beobachtet werden, die beide durch Berberinsulfat fluorochemiert wurden. Auch hier kam die Fluoreszenz wie bei den zuerst beschriebenen Granula fast unmittelbar nach einsetzender Bestrahlung zum Erlöschen. Nach mehrstündigem Deckglasabschluß fand ich keine fluoreszierenden „Körper“ bzw. Fäden.

Wurden mit Berberinsulfat gefärbte Hefezellen nach wenigen Minuten Deckglasabschluß im Blaulicht betrachtet, so konnten das Verlöschen der „primären“ Granulafluoreszenz und die unter der Strahleneinwirkung beginnende „sekundäre“ Granulafluoreszenz nacheinander beobachtet werden. Dabei zeigten einige der „primär“ fluoreszierenden Granula anscheinend auch eine „sekundäre“ Fluoreszenz. Umgekehrt schienen alle „sekundär“ fluoreszierenden Granula vorher eine „primäre“ Fluoreszenz aufzuweisen. Allerdings fluorescierte hier „primär“ nicht das ganze Granulum, sondern allem Anschein nach nur ein kleinerer „Kern“, während bei der „sekundären“ Fluoreszenz das Fluoreszenzlicht sehr intensiv vom ganzen Granulum ausgestrahlt wurde. Die „sekundär“ fluoreszierenden Granula befanden sich zum Teil mit einer gewissen Häufung an der Grenze Vacuole/Cytoplasma, zum Teil waren sie auch im Cytoplasma verteilt. Die nur „primär“ fluoreszierenden Granula lagen zerstreut im Cytoplasma, vorwiegend an der Peripherie der Zelle. Nach 1 tägigem Deckglasabschluß war keine Granulafluoreszenz mehr festzustellen.

Färbung mit Sudanschwarz B

Verwendet wurde eine Lösung in 70%igem Alkohol (siehe ROMEIS). Die Zellen wurden sofort nach dem Aufschwemmen in der Farblösung betrachtet. Nach kurzer Zeit wiesen alle Zellen blaugefärbte Granula in reichlicher Anzahl auf. Größere gefärbte „Körper“ beobachtete ich nie.

Färbung mit Nilblau

Die Hefezellen wurden nach 4 min Färbedauer in Nilblaukonzentrationen von 1 : 10000 und 1 : 20000 in Leitungswasser gelöst, untersucht. Im Hellfeld zeigten nur die Vacuolen eine blaue Färbung. Zum Teil traten in den gefärbten Vacuolen Entmischungerscheinungen auf. Im Blaulicht fluorescierten nur die Granula schwach orange, während Cytoplasma und Vacuole ohne Fluoreszenz waren. Nach 1 Std Deckglasabschluß (Vaselineumrandung) fluorescierten die Granula intensiv goldgelb. Bei Zugabe von H_2O_2 erlosch die goldgelbe Granulafluoreszenz. Nur eine schwache orange Fluoreszenz blieb bestehen (siehe GUTZ 1956).

Färbung mit Neutralrot

Die Konzentrationen der verwendeten Farbstofflösungen betrugen 1:10000 und 1:20000, in Leitungswasser gelöst. Die Untersuchung erfolgte mit einer Wasserimmersion. Sofort nach dem Aufschwemmen der Hefe in der Farblösung war eine schöne rote Vacuolenfärbung zu sehen. Bei knospenden Zellen beobachtete ich in Mutter- und Tochterzelle je eine größere gefärbte Vacuole. Selten erschienen in einer Zelle auch zwei größere gefärbte Vacuolen. Entmischungserscheinungen konnten häufig als sichelförmige Bildungen am inneren Vacuolenrand oder als kugelige Gebilde in der Vacuole festgestellt werden (GUILLIERMOND 1923, KÜSTER 1956, S. 568). Eine Verbindung der Vacuolen von Mutter- und Tochterzelle ließ sich nie feststellen. Im Blaulicht war nur eine diffuse gelbliche Cytoplasmafluoreszenz zu erkennen.

Färbung mit Rhodamin B

Die Konzentration des in Leitungswasser gelösten Farbstoffes betrug 1:10000. Nach 5 und 10 min Färbedauer wurde bei Sofortbeobachtung nur in wenigen Zellen eine leuchtend gelbe Cytoplasmafluoreszenz festgestellt. Die Mehrzahl der Zellen wies keinerlei Fluoreszenz auf. Nach $\frac{1}{2}$ - und 18stündigem Deckglasabschluß (Vaselineumrandung) zeigten auch die vorher nicht fluorchromierten Zellen eine schwache, diffuse gelbe Cytoplasmafluoreszenz. Granula oder andere Strukturen fluorescierten nicht. Im Hellfeld konnte zu keinem der angegebenen Zeitpunkte eine Färbung beobachtet werden.

b) Hefestamm YF

Im Hellfeld erschienen lichtbrechende Granula zum Teil kranzförmig um die Vacuole gelagert, zum Teil lagen sie auch im Cytoplasma verstreut.

Im Phasenkontrast traten die im Cytoplasma verstreuten oder am Rand der Vacuole gelagerten Granula besonders deutlich hervor.

Die Färbeversuche erbrachten die gleichen Ergebnisse wie mit Zellen des Stammes S. Bei einer 9 Std alten Schrägagar-Kultur wurde eine Doppelfärbung mit Diazingrün 1:20000 und Neutralrot 1:10000 vorgenommen. Bei Beobachtung mit einer Wasserimmersion im Hellfeld erschienen nur die Vacuolen rot gefärbt. In knospenden Zellen konnte außerdem ein blau gefärbter größerer „Körper“ beobachtet werden, der in einigen Fällen gerade in dem Isthmus zwischen Mutter- und Tochterzelle lag. Der „Körper“ entfärbte sich, während die Vacuole gefärbt blieb.

c) Hefestamm YFA

Im Hellfeld waren in den Zellen lichtbrechende Granula zu sehen, die im Phasenkontrast schwarz erschienen.

Färbung mit Diazingrün

Im Hellfeld trat während der Beobachtungszeit von $\frac{1}{2}$ Std mit der Wasserimmersion keine sichtbare Färbung auf. Nach 1—3stündigem Deckglasabschluß (Vaselineumrandung) beobachtete ich im Blaulicht nur eine sehr schwache orangerote Cytoplasmafluoreszenz. Auch bei längerer Bestrahlung trat keinerlei Veränderung ein.

d) Hefestamm A 12

Im Hellfeld waren lichtbrechende Granula sichtbar. Im Phasenkontrast wurde außer schwarz erscheinenden Granula in einzelnen Zellen ein dunkelgrauer „Körper“ beobachtet.

Färbung mit Diazingrün

Bei Betrachtung im Hellfeld mit einer Wasserimmersion konnte außer blau gefärbten Granula vereinzelt auch ein blau gefärbter „Körper“ beobachtet werden, der sich wie die Granula entfärbte. Nach 10 min Deckglasabschluß zeigte das Cytoplasma eine orange-rote Fluoreszenz. Nach kurzer Bestrahlungsdauer trat auch gelblich-weiße Granulafluoreszenz ein. Im Hellfeld wiesen Cytoplasma oder Vacuole eine schwache rötliche Färbung auf. Nach 25 min Deckglasabschluß war in einigen Zellen außer der Cytoplasmafluoreszenz (orange) eine gelblich-weiße Granulafluoreszenz zu erkennen. Nach 1 Std Deckglasabschluß fluorescierte das Cytoplasma orange bis schwach hellgelblich. Eine Granulafluoreszenz trat erst bei Bestrahlung auf. Einige Zellen erschienen im Fluoreszenzbild tief orangerot gefärbt (tote Zellen?). Im Hellfeld waren fast alle Zellen ungefärbt. Nur einige wenige, bei denen das Cytoplasma zum Teil von der Wand gelöst war, zeigten rötliche Cytoplasma- und Granulafärbung. Auch nach 3stündigem Deckglasabschluß war eine Granulafluoreszenz nur durch Bestrahlung bei einem Teil der Zellen zu erhalten. Nach 1 tägigem Deckglasabschluß zeigten alle Zellen nur eine gelblich-weiße oder auch orange Cytoplasmafluoreszenz.

Färbung mit Berberinsulfat

Bei Färbung mit Berberinsulfat ließ sich auch bei dem Stamm 4 12 außer einer schwachen diffusen Cytoplasmafluoreszenz eine „primäre“ Fluoreszenz von Granula feststellen, die nach kürzester Bestrahlungsdauer verschwand. Nach einer halben Stunde Deckglasabschluß konnte eine „sekundäre“ Granulafluoreszenz beobachtet werden, die auch bei längerer Strahleneinwirkung bestehen blieb.

Färbung mit Nilblau

Mit Nilblau erhielt man im Blaulicht wie bei den vorher untersuchten Stämmen nach Deckglasabschluß eine goldgelbe Granulafluoreszenz. Es wurden keine größeren „Körper“, analog den im Phasenkontrast sichtbaren, fluorochromiert.

Färbung mit Rhodamin B

Sofort nach Deckglasabschluß zeigte die Mehrzahl der Zellen eine schwache diffuse, einige Zellen auch leuchtend gelbe Cytoplasmafluoreszenz. Nach ½- und 18stündigem Deckglasabschluß (Vaselineumrandung) war das Bild unverändert. Eine Granulafluoreszenz oder eine Hellfeldfärbung beobachtete ich zu keinem der angegebenen Zeitpunkte.

Färbung mit Sudanschwarz B

Die Färbung ergab wie bei den übrigen Stämmen eine blaue Granulafärbung. Vereinzelt wurde in Zellen mit geringer Anzahl gefärbter Granula ein größerer Körper, von dem ein fadenförmiger Fortsatz ausging, angefärbt.

Eine Färbung mit Neutralrot führte ich nicht aus.

2. Hefe aus Gärröhrchen

Sterile Gärröhrchen wurden mit einer Hefeaufschwemmung in einer der beiden verwendeten sterilen Nährlösungen beschickt. Die relative Trübungsintensität der Würze bzw. des „Milieu 3 S“ allein betrug im Durchschnitt 3,0. Die Bestimmung der relativen Trübungsintensität der verwendeten Hefeaufschwemmungen ergab einen Durchschnittswert von 10,0. Die Messung erfolgte mit einem Leitz-Kompensationsphotometer mit Nephelometereinrichtung (Filter 60). Die Gärung setzte meist ein nach ungefähr 3 Std Aufenthalt im Brutschrank bei 28° C. Die Beobachtung erstreckte sich vom Beginn der Gärung an über einen Verlauf von 4 Std.

Vor Zugabe der Farblösungen wurde die Hefe von der Nährlösung abzentrifugiert und mit reinem Leitungswasser oder Leitungswasser + 1% Glucose ausgewaschen. Die Ausführung der Färbungen erfolgte wie unter 1a).

a) Hefestamm S

Im Hellfeld konnten keine lichtbrechenden Granula festgestellt werden. Im Phasenkontrast waren außer sehr kleinen schwarzen Granula häufig nur kleine dunkelgraue Granula oder ein größerer dunkelgrauer „Körper“ zu sehen. In günstigen Fällen konnten auch feine Fäden in geringer Anzahl beobachtet werden. Manchmal erstreckte sich ein langer Faden von der Mutter- bis in die Tochterzelle. Meistens waren jedoch die Fäden kürzer, und es konnte beobachtet werden, wie sich aus ihnen 2 oder 3 kleine dunkelgraue Granula bildeten. Die Fäden gingen zum Teil von den dunkelgrauen „Körpern“ aus, zum Teil lagen sie einzeln im peripheren Cytoplasma.

Färbung mit Diazingrün

Mit Diazingrün wurden nur kurz nach Beginn der Gärung Granula im peripheren Cytoplasma oder auch ein langer Faden zwischen Mutter- und Tochterzelle angefärbt. Nach kürzester Zeit erfolgte die Entfärbung. Nach 1 stündigem Deckglasabschluß trat nur eine schwache orange Cytoplasmafluoreszenz auf, die sich bei Bestrahlung mit Blaulicht zum Teil verstärkte.

Färbung mit Berberinsulfat

Nach Färbung mit Berberinsulfat war außer einer schwachen weißlich-gelben Cytoplasmafluoreszenz nur eine kaum wahrnehmbare „primäre“ Granulafluoreszenz zu erkennen. Diese wurde bei Bestrahlung augenblicklich gelöscht. Auch nach mehrstündigem Deckglasabschluß konnte keine Granulafluoreszenz beobachtet werden. Die schwache weißlich-gelbe Cytoplasmafluoreszenz veränderte sich bei Bestrahlung nicht. Nach 24stündiger Gärung fielen im Phasenkontrast in allen Zellen größere schwarze Granula auf. Nach Berberinsulfatfärbung und Deckglasabschluß von $\frac{1}{2}$ Std war sofort bei Einschalten des Erregerlichtes eine gelbliche Granulafluoreszenz sichtbar, die auch bei längerer Bestrahlung bestehen blieb.

Färbung mit Sudanschwarz B

Nach Sudanschwarz B-Behandlung beobachtete ich keine Granulafärbung.

An Hefe aus Gärröhrchen wurden entsprechende Phasenkontrastbeobachtungen und Färbungen mit gleichem Ergebnis bei den Stämmen *YF* und *A 12* unternommen. Bei *A 12* waren im Phasenkontrast außer dunkelgrauen Granula auch immer kleine schwarze Granula zu sehen. Gärende Hefe des Stammes *YFA* zeigte im Hellfeld keine lichtbrechenden Granula. Im Phasenkontrast beobachtete man nur wenige, dunkelgraue Granula oder ein dickes, kurzes stäbchenförmiges dunkelgraues Gebilde zwischen Mutter- und Tochterzelle. Färbungen führte ich nicht aus.

3. In flüssigem Medium belüftete Hefe

Die Hefe wurde in 85 ml sterilem „Milieu 3 S“ aufgeschwemmt und in einer sterilen Gaswaschflasche mit Glasfritte (Inhalt 100 ml) im Brutschrank bei 28° C mit Preßluft belüftet (vgl. TAVLITZKI 1949, EPHRUSSI et al. 1956). Die Luft durchlief vor ihrem Eintritt in das Versuchsmedium eine trockene Waschflasche mit steriler Baumwollwatte und danach eine Waschflasche mit sterilem destilliertem Wasser.

Zu Beginn eines jeden Versuches wurde die relative Trübungsintensität mit dem Nephelometer gemessen. Sie betrug durchschnittlich 7,6. Es empfahl sich, als Maß für das Wachstum der untersuchten Hefe die Zunahme der relativen Trübungsintensität zu wählen. Sie wurde im Verlauf von 10—12 Std alle 60 min und zur Zeit des steilen Wachstumsanstieges alle 30 min durch Probeentnahmen unter sterilen Bedingungen ermittelt. Parallel zu den Trübungsmessungen erfolgten Beobachtungen unter dem Phasenkontrastmikroskop und Färbungen mit Diazingrün. Belüftet wurde anfänglich mit etwa 130 Luftblasen/min. Nach 5 bzw. 7 Std konnte, da die Schaumentwicklung nachgelassen hatte, mit 150 und 170 Luftblasen/min belüftet werden.

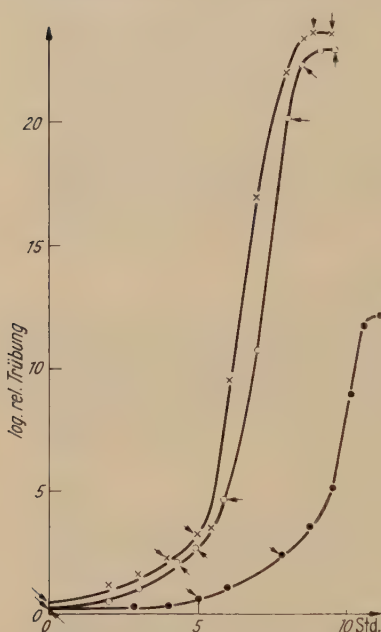


Abb. 1. Wachstumskurven verschiedener Hefestämme (flüssiges „Milieu 3 S“ bei 28° C unter Belüftung). × — × Stamm S;

○ — ○ Stamm YF; ● — ● Stamm A 12. Auf der Abszisse ist die Versuchszeit in Stunden, auf der Ordinate sind die Logarithmen der relativen Trübung als Maß des Wachstums abgetragen. Die Pfeile zeigen das Auftreten des im Phako dunkelgrauen, mit Diazingrün (= Janusgrün B) färbaren „Körpers“ an

a) Analyse im Phasenkontrastmikroskop

In bezug auf die Granula ähnelte das im Phasenkontrast sichtbare cytologische Bild sehr dem auf Schrägagar kultivierter Hefe. Es unterschied sich wesentlich von dem Bild, das gärende Hefe zeigte. Die im Phasenkontrast schwarz erscheinenden Granula waren während der Beobachtungszeit in reichlicher Anzahl sichtbar. Bei gärender Hefe verschwanden sie vollständig oder waren sehr klein und nur in geringer Zahl vorhanden (siehe S. 77).

Ein dunkelgrauer „Körper“ ließ sich bei den Stämmen S und YF zu Beginn der Versuche nachweisen. Er trat erneut in Erscheinung nach ungefähr $4\frac{1}{2}$ —9 Std, zu Beginn und zum Ende des steilen Anstieges der Wachstumskurve (vgl. Abb. 1). Bei dem Stamm YF war der dunkelgrau „Körper“ zarter, kleiner und schwerer erkennbar. Bei den darauffolgenden Beobachtungen wurden neben den schwarz erscheinenden Granula auch winzige dunkelgraue bzw. sehr kleine schwarze Granula

sichtbar. Fädige Gebilde beobachtete ich nie. Bei *Saccharomyces* (A 12) konnte ein dunkelgrauer „Körper“ am Anfang der Versuche sowie 5 und 8 Std nach Versuchsbeginn festgestellt werden. Später waren die Bilder durch die stark vergrößerten Vacuolen und die im umgebenden schmalen Cytoplasmabereich zusammengedrängten Granula unübersichtlich.

b) Färbung mit Diazingrün

Die aus der belüfteten Waschflasche entnommene Probe wurde zentrifugiert und mit Leitungswasser ohne oder mit Zusatz von 1% Glucose ausgewaschen.

Mit Diazingrün färbten sich im Hellfeld entsprechend den Beobachtungen im Phasenkontrast außer den Granula zu bestimmten Zeitpunkten auch größere „Körper“. Vollständige Entfärbung trat wie bei den Granula innerhalb 6—10 min ein. Gefärbte fädige Gebilde stellte ich nie fest. Während des steilen Anstieges der Wachstumskurve (Abb. 1) war mit Diazingrün bei Zellen der Stämme *S* und *YF* nur eine sehr schwache, schnell verblassende oder keine Färbung der Granula zu erhalten. Eine schwache Granulafluoreszenz nach Deckglasabschluß (15—30 min) trat vereinzelt nur während der ersten 3 Std des Wachstums im belüfteten flüssigen Medium auf. Nach 4 Std Wachstum war im Hellfeld nur eine blasse, schnell verschwindende Granulafärbung zu beobachten. Nach Deckglasabschluß trat bei einer Beobachtung im Abstand von 5 min während 40 min keinerlei Granulafluoreszenz auf. Im Hellfeld erschienen schon nach 10 min alle Zellen farblos.

Bei *Saccharomyces* (A 12) ergab sich während der Zeit, in der die Wachstumskurve aufgestellt wurde, mit Diazingrün immer eine Granulafärbung im Hellfeld. Diese war besonders gut nach 6—8stündigem Wachstum der Hefe im belüfteten Medium zu beobachten. 3 min nach Aufschwemmung der Hefe in der Farblösung färbten sich die gleichmäßig im Cytoplasma verteilten Granula. Eine Entfärbung über eine rötliche Farbstufe erfolgte nach ungefähr 6 min Verbleib in der Farblösung. Nach 10—11 min entfärbten sich die Granula plötzlich und gleichzeitig färbte sich das Cytoplasma schwach rötlich. Nach Entfärbung des Cytoplasmas waren die Vacuolen schwach rötlich getönt. Nach Deckglasabschluß von 15—45 min fluorescierte das Cytoplasma orange bis rot. Die Granula fielen durch eine schwache weißlich-gelbe Fluoreszenz auf, die bei Bestrahlung schnell in ein leuchtendes Gelb überging. Gegenüber den aus Schrägagar-Röhrchen und aus der belüfteten Waschflasche während der ersten 3 Std (Phase des verzögerten Wachstumsbeginns, siehe Abb. 1) entnommenen Proben war bei der belüfteten flüssigen Kultur von der 4. Std an eine deutliche Beschleunigung des Eintretens der Granulafluoreszenz mit Diazingrün festzustellen. Nach 3 min dauernder

Färbung und nachfolgendem mehrstündigem Deckglasabschluß erschien nur das Cytoplasma schwach orange bis hell-gelblich fluoreszierend. Eine Veränderung trat bei der Bestrahlung nicht ein.

B. Besprechung der Ergebnisse

In den Zellen aller untersuchten Hefestämme lassen sich sowohl im Hellfeld als auch im Phasenkontrast Granula nachweisen, die während der Zellsprossung auf Mutter- und Tochterzellen verteilt werden. Die im Hellfeld stärker lichtbrechenden Granula sind identisch mit den im Phasenkontrast schwarz erscheinenden Granula, während die kleineren, im Phasenkontrast dunkelgrau erscheinenden Granula in ungefärbtem Zustand im Hellfeld nicht beobachtet werden können. Die im Phasenkontrast dunkelgrauen kleineren Granula treten zu bestimmten Zeitpunkten besonders auffällig in Erscheinung, nämlich dann, wenn die Zahl der im Phasenkontrast schwarzen Granula infolge wiederholter Zellteilungen auf ein bestimmtes Minimum gesunken ist. Die neu auftretenden Granula werden schnell größer und erreichen nach ungefähr 2 Std Größe und Aussehen der übrigen Granula (vgl. auch R. MÜLLER 1956b). Es handelt sich also bei den beiden Erscheinungsformen von Granula allem Anschein nach um verschiedene Entwicklungszustände ein und desselben Zellorganells. Sowohl die im Phasenkontrast schwarz erscheinenden „sphärosomenähnlichen“ Granula, als auch die kleineren dunkelgrau erscheinenden Granula färben sich bei Sauerstoffzutritt mit Janusgrün B (= Diazingrün)¹ blau. Daß sich tatsächlich die im Hellfeld lichtbrechenden Granula mit Janusgrün B färben, konnte an isolierten, im Phasenkontrast vorher analysierten und anschließend einzeln gefärbten Hefezellen wiederholt beobachtet werden. Eine vitale Blaufärbung der Sphärosomen in den Zellen höherer Pflanzen durch Janusgrün B ist nach Untersuchungen an *Allium*-Oberepidermiszellen nicht bekannt (DRAWERT 1953).

Die Giftigkeit von Janusgrün B für die lebende Zelle haben GUILLIERMOND (1930) sowie GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1940, 1946) geprüft. Dementsprechend wurde in unseren Versuchen nur die Farbstoffkonzentration 1:20000 angewendet. Als strenges Kriterium einer wirklichen Vitalfärbung durch Janusgrün B gilt im übrigen die Entfärbung der damit gefärbten Strukturen (SHOWACRE 1953), vor allem bei Sauerstoffmangel. Bei den untersuchten Hefestämmen war auch bei Sauerstoffzutritt (Beobachtung mit Wasserimmersion, ohne Deckglas) stets eine Entfärbung der blau gefärbten Granula über die Reduktionsstufe des „Rosaderivats“ (Safranin) zu beobachten. Nach Ablauf von 15 min waren die gefärbten Granula im allgemeinen entfärbt. Blaufärbungen, die länger als 20 min anhielten, wurden nicht mehr als vital angesehen.

¹ Die Versuche wurden zwar in erster Linie mit dem Präparat Diazingrün von Merck durchgeführt, da aber Diazingrün nach DRAWERT (1953) mit Janusgrün B weitgehend identisch ist, soll im folgenden zur Vermeidung von Konfusionen nur von Janusgrün B gesprochen werden.

Die Fluorochromierung der Granula nach Färbung mit Janusgrün B und nachfolgendem Sauerstoffabschluß (Deckglasbedeckung, Vaselineumrandung) ist vom Funktionszustand der Hefezelle abhängig. Sie tritt jedoch fast sofort ein, wenn noch blau oder rosa gefärbte Granula unter dem Fluoreszenzmikroskop kurze Zeit bestrahlt werden (Blaulicht). Als Lichtquelle diente eine Kohlebogenlampe. Bei Verwendung der energiereicheren Quecksilberhöchstdrucklampe (Type HBO 200, Osram) als Erregerlichtquelle fluorescierten die Granula sofort beim Einschalten der Lampe, so daß man nicht sicher entscheiden kann, ob die Fluoreszenz auf eine Reduktion des Farbstoffes vor der Bestrahlung zurückzuführen ist oder erst auf Grund der Strahleneinwirkung eingetreten ist. Wie das Neutralrot (DRAWERT u. METZNER 1956) wird nach noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen im hiesigen Institut auch sehr wahrscheinlich das Janusgrün B-Molekül durch die UV-Strahlen zertrümmert, wobei eine fluoreszierende Komponente entsteht. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde deshalb immer eine Kohlebogenlampe als Erregerlichtquelle verwendet. Bei den im Hellfeld bereits völlig entfärbten Granula konnte auch durch längere Bestrahlung keine Fluoreszenz ausgelöst werden. Die durch Bestrahlung hervorgerufene Granulafluoreszenz ist im Gegensatz zu der allein durch die Lebenstätigkeit der Zelle bewirkten Granulafluoreszenz noch nach 2tägigem Deckglasabschluß erhalten.

Durch die Anfärbung mit Janusgrün B und Reduktion des Farbstoffes an seinem Fixierungsort zu dem „Rosaderivat“ kann man die Granula der Hefezelle wohl als Orte reger Fermenttätigkeit ansprechen. Daß es nicht immer oder nicht in allen Fällen zu einer Reduktion bis zur Leukostufe kommt, könnte zweierlei Gründe haben. Entweder reicht das vorhandene Redoxpotential nicht aus, um die Reduktion zu Ende zu führen, oder das zum roten Safranin reduzierte Janusgrün B verläßt seinen Reduktionsort, die Granula, auf Grund einer verminderten Affinität zu diesen vermutlich lipoidreichen Strukturen. Das letztere nehmen GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1939) an.

Auf Lipoidreichtum der Hefegranula lassen einmal deren optische Eigenschaften (Lichtbrechung, dunkler Phasenkontrast) und zum anderen die Färbung mit dem Fettfarbstoff Sudanschwarz B und die sauerstoffunabhängige Fluorochromierung mit Nilblau schließen. Das rote Safranin wandert von den Granula über das Cytoplasma in die Vacuolen, aus denen es wahrscheinlich nach außen abgegeben wird. GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1937b, 1938) haben die Ausscheidung von Neutralrot und Nilblau durch die Vacuolen pflanzlicher Zellen beschrieben. Während der Färbung war das Wachstum sistiert. Es setzte erst wieder nach der Ausscheidung der Farbstoffe ein. Anscheinend wird auch die in einigen Fällen durch die Lebenstätigkeit der Zelle entstehende,

in den Granula sichtbare fluoreszierende Reduktionsstufe des Janusgrün B nicht für längere Zeit gespeichert, sondern von den Granula wieder abgegeben.

Nach einer Hypothese von LAZAROW u. COOPERSTEIN (1953) soll die elektive Färbung der Chondriosomen dadurch zustande kommen, daß das Janusgrün B unspezifisch vom gesamten Zellplasma adsorbiert, aber von diesem mit Ausnahme der Chondriosomen sofort reduziert wird. In oder auf den cytochromoxydasehaltigen Chondriosomen soll der Farbstoff in der oxydierten Form erhalten bleiben. Gegen diese Vorstellung wendet sich DRAWERT (1956), da die Reduktion des Farbstoffes außerhalb der Chondriosomen im Plasma fluoreszenzmikroskopisch zu verfolgen sein müßte. Das ist aber nicht der Fall. Da die Hefe unter anaeroben Verhältnissen das Janusgrün B bis zur Leukostufe reduzieren kann, müßte bei einem Zutreffen der Annahme von LAZAROW u. COOPERSTEIN, daß zuerst das Cytoplasma den Farbstoff reduziert, dieses auch zuerst gelblich-weiß fluoreszieren. Eine gelblich-weiße Fluoreszenz kann jedoch zuerst an den Granula beobachtet werden, während das Cytoplasma noch eine wahrscheinlich durch das rote Safranin bedingte orangefarbene Fluoreszenz zeigt. Nach DRAWERT (1953) weist das rote Safranin im adsorbierten Zustand eine rote Fluoreszenz auf.

Mit Berberinsulfat erhielt ich, abgesehen von der bei Sauerstoffabschluß und unter der Strahlenwirkung vergänglichen „primären“ Granulafluoreszenz, nach Sauerstoffabschluß und Bestrahlung noch eine zweite, beständige Granulafluoreszenz (siehe auch DRAWERT u. KÄRBER 1956). Eine genaue Identifizierung der jeweils fluoreszierenden Granula war dabei nicht möglich, da die Methode der Isolierung und Färbung von einzelnen Zellen hier versagte. Auf dem durch Berberinsulfat ebenfalls fluorochromierten Gelatinefilm war das Auffinden der Zellen innerhalb kurzer Zeit und das Erkennen von Einzelheiten unmöglich. Im Hinblick auf die fluoreszenzoptischen Beobachtungen bei der Färbung von Hefeaufschwemmungen mit Berberinsulfat, die phasenkontrastoptischen Beobachtungen und die Ergebnisse der Janusgrün B-Färbung möchte ich jedoch annehmen, daß durch Berberinsulfat alle Granula „primär“ fluorochromiert werden. Die „sekundäre“ Fluoreszenz scheint dagegen nur an den im Phasenkontrast schwarz erscheinenden Granula aufzutreten.

Vom Berberinsulfat ist aus Versuchen von STRUGGER (1939) bekannt, daß es nur im adsorbierten Zustand stärker fluoresziert. DRAWERT (1953) zeigte, daß eine Fluoreszenz auch auftritt, wenn man den Farbstoff aus der wäßrigen Lösung mit Chloroform oder Olivenöl (beides nur bei stark alkalischer Reaktion möglich) bzw. mit Chloroform unter Zusatz von Ölsäure ausschüttelt. Durch Behandlung mit Reduktionsmitteln kann die Lipophilie des Berberinsulfats gesteigert werden, und das entstehende Produkt weist in den hydrophoben Lösungsmitteln eine sehr intensive Fluoreszenz auf. Die „sekundäre“ Fluoreszenz der Hefegranula könnte durch eine entsprechende Veränderung des Berberinsulfats durch die Lebenstätigkeit der Zelle und eine zeitweilige Speicherung des lipoidlöslichen Produktes in den Granula erklärt werden. Möglich wäre aber auch eine durch den Deckglasabschluß bedingte Stoffwechseländerung und Anreicherung von Fettsäuren in den Granula. Dadurch würde ebenfalls eine Speicherung in den Granula begünstigt werden, „ohne daß der Farbstoff selber dabei in seiner Struktur verändert wird“ (DRAWERT 1953). Die

„sekundäre“ Fluoreszenz der Granula mit Berberinsulfat bleibt ebenso wie die Fluorochromierung mit der farblosen Stufe des Janusgrün B nicht für unbegrenzte Zeit erhalten (vgl. S. 74, 73). Auch hier muß eine allmähliche Sekretion des gespeicherten Farbstoffes angenommen werden.

Außer an normalen Hefezellen wurden entsprechende Färbeversuche bei der atemungsgehemmten Mutante *YFA* unternommen. Nach SŁONIMSKI u. EPHRUSSI (1949) und EPHRUSSI u. SŁONIMSKI (1955) fehlen der Mutante die beiden Enzyme Cytochromoxydase und Bernsteinsäuredehydrogenase. Diese sind bei der normalen Hefezelle auf bestimmten Granula lokalisiert, wie die Autoren durch fraktionierte Zentrifugierung zeigten. Nun lassen sich bei der Mutante zwar im Hellfeld lichtbrechende Granula und im Phasenkontrast schwarz erscheinende, sowie wenige dunkelgraue Granula nachweisen. Auch mit Sudanschwarz B und Nilblau bekommt man eine Granulafärbung bzw. -fluorochromierung. Mit Janusgrün B, das den direkten Sitz der Cytochromoxydase angeben soll (vgl. EPHRUSSI u. SŁONIMSKI 1955), und mit dem zur Chondriosomenfluorochromierung verwendeten Berberinsulfat (DRAWERT 1953) erhielt ich jedoch keine Granulafärbung bzw. „primäre“ Granulafluoreszenz. Auch durch längeren Deckglasabschluß und Bestrahlung mit Blaulicht ist mit beiden Farbstoffen keinerlei Granulafluoreszenz zu erreichen.

Die Granula der „Cytochromoxydase-defekten“ Mutante lassen sich aber mit dem durch Autoxydation gebildeten Indophenolblau färben (Herstellung des Nadi-Reagens nach PERNER 1952a). Das ist ein Hinweis mehr, mit welcher Vorsicht Schlüsse aus einer positiven Nadi-Reaktion auf das Vorhandensein bzw. den Sitz von Cytochromoxydase gezogen werden sollten.

Aus dem färberischen Verhalten der Granula der normalen Hefen gegenüber Janusgrün B und Berberinsulfat und dem Ausbleiben der entsprechenden Reaktionen bei den Granula der „Cytochromoxydase-defekten“ Mutante kann man mit EPHRUSSI u. SŁONIMSKI (1955) sowie YOTSUYANAGI (1955) schließen, daß die Mutante zwar die den normalen Granula entsprechenden Strukturen besitzt, diese jedoch funktionell inaktiviert sind. Die Fähigkeit zur adaptiven Bildung der Atmungsfermente ist hier anscheinend verloren gegangen.

Aerob in flüssigem Medium gewachsene normale Hefe zeigte in der exponentiellen Wachstumsphase ebenso wie gärende Hefe keine Granulafärbung mit Janusgrün B, obwohl im Phasenkontrast Granula nachweisbar waren. Hier handelt es sich jedoch um reversible Inaktivierung der Cytochromoxydaseaktivität, die durch die Zuckerkonzentration („contre-effet Pasteur“, siehe EPHRUSSI et al. 1956) bzw. das Fehlen von Sauerstoff bedingt wird (EPHRUSSI u. SŁONIMSKI 1950—1951).

Mit Berberinsulfat erhielt ich auch bei gärender Hefe eine ganz schwache „primäre“, bei Bestrahlung sofort verlöschende Granula-

fluoreszenz. Fluoreszenzoptisch kann man bekanntlich noch geringste Konzentrationen nachweisen. Eine „sekundäre“ Granulafluoreszenz trat aber erst am Ende der Gärung auf. Im Phasenkontrast wurden dann die schwarz erscheinenden Granula wieder in reichlicher Anzahl beobachtet, wogegen sie während der Gärung neben den vorwiegend sichtbaren kleinen dunkelgrauen Granula überhaupt nicht oder nur in geringer Anzahl und Größe auftraten. MEISSEL (1938 b) schreibt in bezug auf *Saccharomyces ludwigii*: „In the absence of fermentable carbohydrates . . . the chondriome of the cells preserves even in a liquid medium the type which is characteristic of breathing yeast cells.“ Das Nicht-Auftreten der „sekundären“ Fluoreszenz beruht hier offenbar auf dem Fehlen lipoid-reicher Strukturen während der Gärung, so daß eine Farbstoffspeicherung ausbleibt. Die Sudanschwarz B-Färbung verlief während der Gärung negativ. Bereits MACALLUM (1899) gibt an, daß der Fettcharakter der Granula bei der Gärung verloren geht, und nach LINDEGREN (1952) ist der Fettgehalt der Granula bei ruhenden Zellen am höchsten.

In den Zellen der zur Gärung befähigten Mutante sowie in Zellen normaler Hefe ließen sich während der Gärung mit Hilfe des Phasenkontrastes neben kleinen schwarzen und dunkelgrauen Granula noch feine dunkelgraue Fäden wahrnehmen. Bei normalen Zellen gelang nur zu Beginn der Gärung eine Färbung bzw. Fluorochromierung dieser Fäden mit Janusgrün B bzw. Berberinsulfat. Die Ursache hierfür sind wohl präformierte Atmungsfermente, deren Konzentration erst im Lauf der Gärung abnimmt. In den Mutantenzellen blieben die entsprechenden Strukturen ungefärbt bzw. zeigten keine Fluoreszenz. Ob es sich bei den Fäden, die während der Beobachtung in ungefärbtem Zustand im Phasenkontrast in kleine dunkelgraue Granula zerfallen können, um eine physiologisch bedingte besonders günstige Funktionsgestalt der Granula handelt, oder ob diese Strukturen als Folge der Stoffwechseländerung auftreten, muß offen bleiben.

Es sei hier nur auf die Beobachtung von PERNER (1952 b) hingewiesen, daß nach längerer Einwirkung von Berberinsulfat auf Epidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium* extrem lange, fadenförmige Chondriosomen auftraten. Diese Erscheinung wurde von einer Atmungshemmung durch das Alkaloid begleitet. Ferner beschreiben MEISSEL u. Mitarb. (1950) für *Saccharomyces ludwigii* eine Atmungshemmung durch Berberin und führen diese auf eine elektive Chondriosomenblockierung durch das Alkaloid zurück. Nach Untersuchungen von LESSER (1957) wirkt aber Berberinsulfat nicht bei allen Objekten atmungshemmend. Während Berberinsulfat den Sauerstoffverbrauch der Blätter von *Lagarosiphon* und des Rübengewebes von *Daucus carota* herabsetzte, führte es bei *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Beschleunigung des Sauerstoffverbrauches. Offenbar scheint die fädige Form des Chondrioms charakteristisch für eine herabgesetzte Atmung zu sein.

Bei der aeroben Kultur normaler Hefen in flüssigem Medium und laufender mikroskopischer Analyse konnten niemals, auch nicht am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, fädige Strukturen durch Janusgrün B

gefärbt oder mit Hilfe des Phasenkontrastes beobachtet werden. In Übereinstimmung mit EPHRUSSI et al. (1956) ließ sich zu gewissen Zeitpunkten mit Janusgrün B ein größeres Gebilde in den Zellen anfärben, das sich ebenso wie die Granula wieder rasch entfärbte. Im Phasenkontrast erschien dieses Gebilde als größerer dunkelgrauer, nicht fest umgrenzter Körper. Es handelte sich dabei nicht um eine Zusammenballung schon vorhandener Granula. In der Deckglaskultur trat der dunkelgraue Körper bei dauernder Beobachtung unter dem Phasenkontrastmikroskop immer dann auf, wenn durch fortgesetzte Zellteilungen die Granulazahl auf ein Minimum gesunken war. Es konnte festgestellt werden, daß der dunkelgraue Körper der Neubildung von Granula dient und allmählich aufgebraucht wird. Er trat immer in unmittelbarer Nähe des Kernes auf und wurde bei der Kernteilung mit ihm zusammen verteilt, wie durch Phasenkontrast-Lebendbeobachtung und Janusgrün B-Färbung klar wurde.

EPHRUSI et al. (1956) nennen den dunkelgrauen Körper „perinucleäre Zone“. Sie läßt sich mit Säurefuchsin (Altmann-Technik zum Chondriosomennachweis) färben. Es konnte gezeigt werden, daß sie auf dem durch Feulgenreaktion oder Methylgrün-Pyronin-Färbung nachgewiesenen Kern gelegen ist und bei der Sprossung diesen auf seiner Wanderung in die Knospe begleitet (EPHRUSI et al. 1956). Schon WAGER u. PENISTON (1910) veröffentlichen Bilder von fixierten, mit Methylgrün und Säurefuchsin gefärbten Hefezellen, die den Kern und die „perinucleäre Zone“ während der Zellsprossung zeigen. THYAGARAJAN u. SUBRAMANIAM (1957) brachten kürzlich Phasenkontrastaufnahmen von *Saccharomyces carlsbergensis*. Ein auf dem Kern liegender dunkler Körper wird als innerhalb einer Kernmembran liegende „geformte Strukturen“ beschrieben, wogegen nach MÜLLER (1956c) der Kern von *S. carlsbergensis* optisch homogen ist. Bei der Beobachtung von THYAGARAJAN u. SUBRAMANIAM könnte es sich ebenfalls um die „perinucleäre Zone“ handeln. Von tierischen Gewebekulturen ist eine Verteilung der Chondriosomen mit dem Kern zusammen bekannt (FREDERIC u. CHÈVREMONT 1952).

Die Bildung des dunkelgrauen Körpers in unmittelbarer Kernnähe ließe sich auf Grund der heutigen elektronenmikroskopischen Kenntnisse (vgl. MÜHLETHALER 1957) leicht mit dem Durchtritt von Proteinen durch eine mit Poren versehene Kernmembran erklären. HYDEN (1947) konnte mit Hilfe der Ultraviolettphotographie bei embryonalen Nervenzellen von *Lophius* die unter Mitwirkung des Nucleolus im Kern erfolgende intensive Proteidproduktion und die Verteilung der gebildeten Proteine und Ribosenucleotide über das Plasma aufzeigen. Sollte hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegen, dann würden die plasmatischen Granula der Hefe sich nicht durch Reduplikation vermehren, sondern immer neu vom Kern gebildet werden.

Bei einem Vergleich der hier mitgeteilten Ergebnisse mit den zitierten Angaben aus der Literatur zeigt sich am ehesten noch eine Parallele mit den von EPHRUSSI, SLONIMSKI u. YOTSUYANAGI erhaltenen Befunden. *Ein ganz grundlegender Unterschied verbietet aber eine Gleichsetzung.* Während EPHRUSSI, SLONIMSKI, YOTSUYANAGI u. TAVLITZKI (1956) betonen, daß durch die Färbbarkeit mit Janusgrün B und nach der Altmann-Methode sich Mitochondrien und lichtbrechende Granula unzweideutig unterscheiden lassen (vgl. auch BRANDT 1942), *kann ich dies für die Vitalfärbung mit Janusgrün B nicht bestätigen.* (Die Altmann-Methode wurde von mir nicht angewandt, da ich nur lebende Zellen untersuchte.) In Übereinstimmung mit HARTMAN u. LIU (1954), BAUTZ (1954, 1955), NAGAI (1955) *konnte ich auch bei den lichtbrechenden Granula eine vorübergehende Färbung mit Janusgrün B beobachten.*

Die Granula der Hefezellen besitzen, ebenso wie es GUTZ (1956) bereits für die Granula in den Hyphen von *Mucor racemosus* festgestellt hat, Eigenschaften, die teils für die Chondriosomen und teils für die Sphärosomen der höheren Pflanze charakteristisch sind. Wie bei *Mucor* kommen aber auch bei der Hefe Einschlüsse vor, die ihrer Gestalt nach typische Chondriosomen sein könnten. Bei der Hefe liegen diese Gebilde in bestimmten physiologischen Zuständen gehäuft an der Peripherie der Zelle. Dies würde gut übereinstimmen mit den elektronenmikroskopischen Beobachtungen von AGAR u. DOUGLAS (1957), daß ähnlich den Chondriosomen submikroskopisch strukturierte Gebilde im peripheren Plasma der Hefe zu finden sind.

Auf Grund der bisherigen Erfahrungen möchte ich mit der Möglichkeit rechnen, *daß die Chondriosomen-ähnlichen Plasmaeinschlüsse und die lichtbrechenden Granula verschiedene Zustände ein und desselben Organells sind.* Je nach der Funktion kann das Organell eine bestimmte Gestalt annehmen. Dieser Gestaltswechsel der Einschlußkörper des Cytoplasmas der Hefezelle im Zusammenhang mit der Funktion, mit dem physiologischen Zustand, wird von fast allen Cytologen hervorgehoben. Ich will hier nur verweisen auf MACALLUM (1899), WAGER u. PENISTON (1910), GRAFFI (1941), BRANDT (1942), LINDEGREN (1949, 1952), BAUTZ u. MARQUARDT (1953b), SARACHEK u. TOWNSEND (1953), YOTSUYANAGI (1955). Ganz charakteristisch scheint dabei eine Art Verfettung zu sein. In diesem Zusammenhang verdienen die Beobachtungen von STEINER u. HEINEMANN (1954a, b) über den Zusammenhang von „Chondriosomen“ und Fettbildung bei *Oospora lactis* eine besondere Beachtung.

Auf alle Fälle erscheint es mir bisher noch nicht möglich, die Einschlüsse der Hefe eindeutig den Chondriosomen oder den Sphärosomen der höheren Pflanzenzelle zuzuordnen. Dazu sind nicht nur noch weitere Untersuchungen an Pilzen notwendig, sondern auch an der höheren Pflanze, und zwar besonders an der embryonalen Zelle.

Zusammenfassung

Zwei verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, ein Stamm von *Saccharomyces ludwigii* und eine atmungsgehemmte Mutante von *S. cerevisiae* wurden unter variierten Wachstumsbedingungen phasenkontrastoptisch und unter Anwendung von Vitalfärbungen vergleichend untersucht.

In allen untersuchten Stämmen lassen sich phasenkontrastoptisch zwei Granulaformen nachweisen. Während der Gärung treten vorwiegend fädige Formen auf, die jedoch in Granula zerfallen können.

Die Färbung der Granula der normalen Hefe mit Janusgrün B bzw. ihre Fluorochromierung mit Berberinsulfat ist vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig. Die Reduktion des Janusgrün B zu seiner ersten, rosa gefärbten Reduktionsstufe erfolgt auf (in) den Granula, wie aus dem Farbwechsel derselben geschlossen werden kann. Der rote Farbstoff kann unter Entfärbung der Granula in das Cytoplasma und schließlich in die Vacuole übergehen. Unter anaeroben Bedingungen (Deckglasabschluß) tritt sowohl nach einer Färbung mit Janusgrün B wie mit Berberinsulfat eine Granulafluoreszenz auf, die wahrscheinlich durch Reduktionsstufen dieser Farbstoffe bewirkt wird. Die reduzierten Farbstoffe werden jedoch nur für eine gewisse Zeit gespeichert. Ihre spätere Sekretion muß angenommen werden.

Die Granula der atmungsgehemmten Mutante zeigen unter keinen Bedingungen eine Färbung oder Fluorochromierung mit Janusgrün B oder Berberinsulfat.

Als Ort der Granulaneubildung läßt sich im Phasenkontrastmikroskop ein „dunkelgrauer Körper“ nachweisen, der in unmittelbarer Nähe des Zellkernes liegt. Dieser „Körper“ läßt sich wie die Granula mit Janusgrün B färben und mit Berberinsulfat fluorochromieren.

Die verschiedenen Plasmaeinschlüsse der Hefezellen können bisher weder den Chondriosomen noch den Sphärosomen der höheren Pflanze einwandfrei zugeordnet werden. Es wird vielmehr mit der Möglichkeit gerechnet, daß die verschiedenen Granulaformen verschiedene Funktionszustände ein und desselben Zellorganells sind.

Herrn Prof. Dr. H. DRAWERT danke ich für die Anregung zu den Untersuchungen.

Literatur

- AGAR, H. D., and H. C. DOUGLAS: J. Bacter. **73**, 365 (1957).
BARTHOLOMEW, J. W., and R. LEVIN: J. Gen. microbiol. **12**, 473 (1955). —
BAUTZ, E.: Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 281 (1954). — Naturwissenschaften **42**, 49 (1955a). — Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 197 (1955b). — Naturwissenschaften **42**, 619 (1955c). — Z. Naturforsch. **11b**, 26 (1956). — BAUTZ, E., u. H. MARQUARDT: Naturwissenschaften **40**, 531 (1953a); **40**, 531 (1953b); **41**, 121 (1954). — BRANDT, K. M.: Protoplasma (Wien) **36**, 77 (1942). — BRENNER, S.: Biochim. et Biophysica Acta **11**, 480 (1953). — BUCHY, A.: Rev. Cytol. et Biol. végét. **5**, 265 (1941).

CASPERSSON, T.: *Naturwissenschaften* **29**, 33 (1941). — Cell growth and cell function. New York 1950. — CASPERSSON, T., u. K. BRANDT: *Protoplasma* (Wien) **35**, 507 (1941).

DEROBERTIS, E. D. P.: Morphology and functional significance of the cytoplasmic organoids. In: DEROBERTIS, E. D. P., W. W. NOWINSKI and F. A. SAEZ: *General cytology*. 2. ed. Philadelphia—London 1955. — DRAWERT, H.: *Flora* (Jena) **134**, 159 (1940). — *Ber. dtsch. bot. Ges.* **65**, 263 (1952); **66**, 134 (1953). — *Naturwissenschaften* **42**, 419 (1955). — Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. In: RUHLAND, W.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Bd. II. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — DRAWERT, H., u. M. KÄRBER: *Naturwissenschaften* **43**, 161 (1956). — DRAWERT, H., u. I. METZNER: *Protoplasma* (Wien) **47**, 359 (1956).

EPHRUSSI, B., H. HOTTINGUER et A. M. CHIMENES: *Ann. Inst. Pasteur* **76**, 351 (1949). — EPHRUSSI, B., H. HOTTINGUER et J. TAVLITZKI: *Ann. Inst. Pasteur* **76**, 419 (1949). — EPHRUSSI, B., PH. L'HERITIER et H. HOTTINGUER: *Ann. Inst. Pasteur* **77**, 64 (1949). — EPHRUSSI, B., and P. P. SLONIMSKI: *Biochim. et Biophysica Acta* **6**, 256 (1950—51). — *Nature* (Lond.) **176**, 1207 (1955) — EPHRUSSI, B., P. P. SLONIMSKI and Y. YOTSUYANAGI: *Nature* (Lond.) **177**, 1041 (1956). — EPHRUSSI, B., Y. YOTSUYANAGI et J. TAVLITZKI: *C. r. Labor. Carlsberg, Sér. physiol.* **26**, 87 (1956).

FREDERIC, J., et M. CHÈVREMONT: *Archives de Biol.* **63**, 259 (1952). — FREY-WYSSLING, A.: *Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologie II*, A 2, Wien 1955.

GEISSLER, E.: *Naturwissenschaften* **42**, 372 (1955). — GRAFFI, A.: *Z. Krebsforsch.* **49**, 477 (1940); **52**, 234 (1941). — GRAFFI, A., u. H. MAAS: *Arb. Staatsinst. exper. Therap., Frankfurt a. M.* **39**, 21 (1940). — GRAFFI, A., H. KRIEGLER, H. SCHREIBER u. F. WINDISCH: *Z. Naturforsch.* **8b**, 142 (1953). — GUILLIERMOND, A.: *Cellule* **32**, 431 (1922). — *C. r. Soc. Biol. (Paris)* **88**, 517 (1923). — *Amer. J. Bot.* **16**, 1 (1929). — *C. r. Soc. Biol. (Paris)* **104**, 468 (1930). — *Protoplasma* (Wien) **16**, 454 (1932). — *The cytoplasm of the plant cell*. Waltham, Mass., USA (1941). — GUILLIERMOND, A., et R. GAUTHERET: *C. r. Acad. Sci. (Paris)* **204**, 1377 (1937a); **204**, 1520 (1937b); **206**, 1848 (1938); **208**, 1061 (1939). — *Rev. gén. Bot.* **52**, 353, 440 (1940); **53**, 25, 121, 158, 212, 315 (1946). — GUTZ, H.: *Planta* (Berl.) **46**, 481 (1956).

HARTMAN, P. E., and CH. LIU: *J. Bacter.* **67**, 77 (1954). — HENRICI, A. T.: *The yeasts. Bacter. Rev.* **5**, 97 (1941). — HYDEN, H.: *Symposia Soc. f. Exper. Biol.* **1**, 142 (1947), zit. nach HARTMANN, M.: *Allgemeine Biologie*. 4. Aufl. Stuttgart 1953.

JANSSENS, F. A., and J. HELSMORTEL: *Cellule* **28**, 451 (1912). — JOHANNES, H.: *Protoplasma* (Wien) **36**, 181 (1942).

KRIEG, A.: *Experientia* (Basel) **10**, 172 (1954). — KÜSTER, E.: *Die Pflanzenzelle*. 3. Aufl. Jena 1956.

LAZAROW, A., and S. J. COOPERSTEIN: *Exper. Cell. Res.* **5**, 56 (1953). — LESSER, P.: *Protoplasma* (Wien) 1957 (im Druck). — LIETZ, K.: *Arch. Mikrobiol.* **16**, 275 (1951). — LINDEGREN, C. C.: *The yeast cell. Its genetics and cytology*. Ed. Pub., Inc. Saint Louis 1949. — *Symposia Soc. f. Exper. Biol.* **6**, 277 (1952).

MACALLUM, A. B.: *Trans. Canadian Inst.* **6**, 39 (1899), zit. nach WAGER, H., and A. PENISTON (1910). — MARQUARDT, H., u. E. BAUTZ: *Naturwissenschaften* **41**, 361 (1954). — *Arch. Mikrobiol.* **23**, 251 (1956). — MEISSEL, M. N.: *Bull. biol. méd. exper. U.R.S.S.* **6**, 294 (1938a). — *Compt. rend. Acad. sc. U.R.S.S.* **20**, 479 (1938b). — MEISSEL, M. N., N. A. POMOTSCHNIKOWA u. JU. M. SCHAWLOWSKI: *Dokl. Akad. Nauk SSSR N. S.* **70**, 1065 (1950). — MICHAELIS, L.: *Arch. mikrosk. Anat.* **55**, 558 (1900). — MÜHLETHALER, K.: *Naturwissenschaften* **44**, 204 (1957). —

MÜLLER, R.: Mikroskopie (Wien) **11**, 36 (1956a). — Naturwissenschaften **43**, 86 (1956b); **43**, 428 (1956c). — MUNDKUR, B. D.: Nature (Lond.) **171**, 793 (1953).

NAGAI, S.; J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. Ser. D, **6**, 1 (1955).

PERNER, E. S.: Biol. Zbl. **71**, 43 (1952a). — Ber. dtsh. bot. Ges. **65**, 52 (1952b). — Protoplasma (Wien) **42**, 457 (1953). — PETERFI, T.: Mikrurgische Methodik. In: ABDERHALDEN, E.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 5, Teil 2, 479 (1932).

ROLL, L.: Naturwissenschaften **42**, 127 (1955). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. 15. Aufl. München 1948.

SARACHEK, A., and G. F. TOWNSEND: Science (Lancaster, Pa.) **117**, 31 (1953). — SCHULTZE, W. H.: Cbl. Bakter. I Orig. **56**, 544 (1910). — SHOWACRE, J. L.: J. Nat. Cancer Inst. (Bethesda) **13**, 829 (1953). — SLONIMSKI, P. P.: Ann. Inst. Pasteur **76**, 510 (1949). — SLONIMSKI, P. P., et B. EPHRUSSI: Ann. Inst. Pasteur **77**, 47 (1949). — SOROKIN, H.: Amer. J. Bot. **25**, 28 (1938); **28**, 476 (1941). — STEFFEN, K.: Chondriosomen und Mikrosomen (Sphärosomen). In: RUHLAND, W.: Handbuch der Pflanzenphysiologie. Bd. I. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — STEINER, M., u. H. HEINEMANN: Naturwissenschaften **41**, 40 (1954a); **41**, 90 (1954b). — STRUGGER, S.: Protoplasma (Berlin) **30**, 85 (1938). — Biol. Zbl. **59**, 274 (1939). — Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949.

TARWIDOWA, H.: Cellule **47**, 203 (1938). — TAVLITZKI, J.: Ann. Inst. Pasteur **76**, 497 (1949). — THYAGARAJAN, T. R., u. M. K. SUBRAMANIAM: Naturwissenschaften **44**, 68 (1957).

UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER: Manometric technics and tissue metabolism. Minneapolis 1951.

WAGER, H., and A. PENISTON: Ann. of Bot. **24**, 45 (1910). — WILLIAMS, M. A., C. C. LINDEGREN and A. YUASA: Nature (Lond.) **177**, 1041 (1956). — WOHLFAHRTH-BOTTERMANN, K. E.: Z. Naturforsch. **12b**, 164 (1957).

YAMAHA, G.: Cytologia (Tokyo) **9**, 193 (1938). — YOTSUYANAGI, Y.: Nature (Lond.) **176**, 1208 (1955).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen über extracelluläre Schleimssubstanzen von *Streptomyces* spec.

Von

NORBERT PFENNIG*

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 16. Oktober 1957)

Bei Bakterien, Pilzen und Algen hat man schon seit langer Zeit verschiedene Arten der Schleimbildung — sowohl unter natürlichen Verhältnissen wie in künstlichen Massenkulturen — beobachtet und in vielen Fällen die je nach den produzierenden Organismen sehr verschiedene chemische Zusammensetzung dieser Substanzen untersucht (vgl. RIPPEL-BALDES 1955, FOSTER 1952, STACEY 1946, ANDERSON 1948, BURGER 1950, SPRINGER 1955, DZULYNSKA u. Mitarb. 1955, EVANS u. HIBBERT 1946, PORTER 1946, MONTGOMERY u. SMITH 1952, TOMCSIK 1953, WHISTLER u. MCGILVRAY 1954, JONES 1955, O'KANE 1956, THIMANN 1955, MARTIN u. ADAMS 1956, SMITHIES u. GIBBONS 1955, CATLIN 1956).

Demgegenüber sind weder in Einzelveröffentlichungen, noch in den umfassenden Monographien über Strahlenpilze von LIESKE (1921) und WAKSMAN (1950) irgendwelche Beobachtungen oder Untersuchungen über Schleimbildung bei *Streptomyces* unter natürlichen oder Züchtungsverhältnissen bekannt geworden. Das sehr „trockene Aussehen“ von *Streptomyces*-Kulturen auf festen Nährböden und das Fehlen einer Schleimschicht um die Hyphen im mikroskopischen Bild lassen die Möglichkeit einer Schleimabsonderung bei ihnen viel weniger vermuten als bei den meisten von vornherein schleimig aussehenden Bakterienkulturen.

In ihren Bilanzen des Kohlenhydratstoffwechsels eines *Streptomyces-griseus*-Stammes gaben HOCKENHULL u. Mitarb. (1954) eine Zunahme des „hydrolysierbaren Kohlenhydratgehaltes“ des Nährmediums im Verlaufe des Wachstums bis zum 6. Tage auf 8 mg/ml an. Sie sprachen von einer „considerable synthesis of sugar polymers“ bzw. „polymerization of sugars“, konnten aber nach papierchromatographischer Analyse dieses Materials keine anderen Zucker als die dem Nährmedium von Anfang an zugesetzten finden: „... but no new substances synthesized during growth could be detected.“ Es läßt sich danach nicht sagen, ob diese „Zuckerpolymerisierung“ direkt etwas mit der im folgenden beschriebenen Schleimbildung bei einem *Streptomyces*-Stamm zu tun hat.

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. RICHARD HARDER zum 70. Geburtstage.

Schon bei früheren Untersuchungen an Actinomycin-bildenden *Streptomyces*-Stämmen (BROCKMANN u. PFENNIG 1953, PFENNIG 1952) fielen stets deren schleimig-dickflüssige Kulturfiltrate auf. Der Schleim machte sich bei der zur Actinomycingewinnung angewendeten Benzolextraktion der Nährlösung unangenehm bemerkbar, weil er sich beim Ausschütteln in der Grenzschicht Benzol-Kulturmedium als dicke Emulsion abschied, welche durch Zentrifugieren zerstört werden mußte. Bei späteren Untersuchungen (PFENNIG 1956, 1957 a) wurde von einem anderen *Streptomyces*-Stamm (Serie *albidoflavus*, BALDACCI 1954), über dessen schleimige Kulturlösungen berichtet. Bei diesen Arbeiten entstand besonderes Interesse an der Natur des Schleimes, da er sich bei den zur Aufarbeitung auf freie Aminosäuren notwendigen elektrolytischen Entsalzungen der Kulturfiltrate stets als schaumige Masse abschied und dadurch der Gesamtbilanz entzogen wurde.

Schleimgewinnung und Reinigung

Die Züchtung des *Streptomyces*-Stammes erfolgte in allen hier beschriebenen Versuchen — sofern es nicht besonders vermerkt ist — genau so, wie in einer früheren Arbeit (PFENNIG 1956) dargestellt worden ist¹.

Das in solchen Flüssigkeits-Schüttelkulturen gezüchtete Mycel zeigte bei Betrachtung in Tuschepräparaten in keinem Altersstadium Schleimhüllen um die Hyphen. Offenbar wird also der Schleim unter diesen Züchtungsbedingungen in derart stark verquollener Form abgegeben, daß er sich direkt in dem umgebenden Kulturmedium auflösen kann. Lediglich bei größeren Mycelflöckchen ließ sich eine Anhäufung von Schleim zwischen den dicht verfilzten Hyphen beobachten.

Um festzustellen, ob der Schleim nur in der stets verwendeten, 2% Glycerin als C-Quelle enthaltenden Nährlösung gebildet wird, oder aber unabhängig von einer bestimmten C-Quelle auftritt und dann noch qualitativ gleichartig zusammengesetzt ist, wurden in parallelen Schüttelkulturansätzen folgende Zuckerarten je 2%ig an Stelle von Glycerin in der sonst unveränderten Nährlösung mit 0,85% NaNO_3 dargeboten: Glucose, Galaktose, Mannose, Fructose, Sorbose, Mannit, Xylose, Saccharose, Lactose, Maltose. Ebenso gut und schnell wie Glycerin wurden zum Wachstum mit Schleimbildung folgende Zuckerarten verarbeitet: Glucose, Mannose, Maltose und Mannit. Mit Galaktose, Lactose und Fructose als C-Quellen benötigte der *Streptomyces*-Stamm 5—10 Tage Adaptation, wuchs dann aber ebenfalls gut mit Schleimbildung. Auch bei noch längerer Kulturdauer trat mit Xylose, Sorbose und Saccharose keinerlei Wachstum ein.

¹ Nährlösung: 2 ml Glycerin (bidest. Merck); 0,85 g NaNO_3 ; 0,1 g KCl; 0,1 g K_2HPO_4 sicc.; 0,01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g CaCO_3 ; 0,1 ml Hoaglandsche Spurenelementlösung; aqua dest. auf 100 ml; pH 7,2.

Die Gewinnung des „Rohschleimes“ erfolgte, wie es bei Bakterien üblich ist, durch Fällung (vgl. FORSYTH 1949) unter Zusatz der vierfachen Menge Äthanol oder Aceton zu dem durch Zentrifugieren vom Mycel befreiten Kulturmedium. Nach 12stündigem Stehen wurde die Fällung abzentrifugiert und mehrere Male mit 80%igem Äthanol und zuletzt mit reinem Äthanol gewaschen. Nach Trocknung bei 70° C wurde die Ausbeute dieses „Rohschleimes“ bestimmt.

In Tab. 1 sind die mit den verschiedenen C-Quellen erhaltenen Trockenmycel- und Rohschleimtrockensubstanz-Gewichte zusammengestellt. Die Kulturen wurden möglichst im Stadium der stärksten Mycelbildung geerntet, welches recht gut an der Farbe der Kulturlösung erkannt werden konnte (vgl. PFENNIG 1956).

Tabelle 1. Schleimbildung bei verschiedenen C-Quellen

Kohlenstoffquelle	Trockenmycel in mg je 100 ml Kulturmedium	„Rohschleim“ in mg	
		je 100 ml Kulturmedium	je 100 mg Trockenmycel
1. Glycerin (0,2% NaNO ₃)	305	33,0	10,8
2. Glycerin.	577	58,6	10,2
3. Glucose	520	54,0	10,4
4. Galaktose	513	33,5	6,5
5. Lactose	428	42,5	10,0
6. Maltose	301	35,0	11,6
7. Mannose	188	104,0	55,3
8. Mannit	445	36,5	8,2
9. Glycerin.	328	38,4	11,7
10. Mannose	603	42,2	7,0

Nr. 2—10 mit 0,85% NaNO₃.

Die so erhaltenen Rohschleime wurden, wie weiter unten genauer angegeben wird, hydrolysiert und qualitativ und halbquantitativ papierchromatographisch auf ihre Zuckerkomponenten hin verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Präparaten aus den verschiedenen C-Quellen-Kulturen festgestellt werden. Die weiteren Reinigungs- und Fraktionierungsversuche wurden deshalb nur noch mit zwei der gewonnenen Schleimpräparate (der Glycerin- und der Mannosekultur) durchgeführt. Dies geschah in Anlehnung an die bei OLIVER-GONZÁLEZ (1954) angegebene Methodik in folgender Weise:

Etwa 50 mg Rohschleimtrockensubstanz wurden mit 15 ml aqua bidest. im Reagensglas aufgeschwemmt und unter kräftigem Umrühren im siedenden Wasserbad 3—5 min erhitzt bis alle Substanzstückchen gelöst waren. Der beim Kochen entstandene feinflockige, grauweiße Niederschlag (coagulierte Proteine) wurde aus der heißen Lösung durch Zentrifugieren bei 6000 U/min von der viscosen, klaren Lösung abgetrennt. Weder Ansäuern in der Kälte mit Essigsäure-Natriumacetat auf pH 4,6 noch Alkalischemachen bis auf pH 8—9 ließ irgendwelche weiteren Proteinverunreinigungen ausfallen — die Lösung blieb völlig klar. Deshalb gab man daraufhin das vierfache Volumen Aceton zu und fällte den Schleim bei 4° C

über Nacht aus. Nach Waschen mit Aceton trocknete man die Fällung bei 70° C. Der ganze Reinigungsvorgang wurde in der gleichen Weise bis zum heißen Abzentrifugieren des durch längeres Aufkochen abermals entstandenen feinen Niederschlages wiederholt. Dann kühlte man die klare viscose Lösung stark ab und zentri-fugierte sie 25 min lang bei 6000 U/min, wobei sich eine glasig-gelblich erscheinende Schleimfraktion A als gallertiger Schleimpfropf abgesetzt hatte, von dem die nun weniger viscose überstehende klare Lösung B abdekantiert werden konnte. Durch mehrmaliges Lösen und Abzentrifugieren (kalt, 6000 U/min) ließ sich diese stark viscose gelbliche Schleimfraktion A weiter reinigen. Ihre Menge betrug nur etwa 5—10% des gesamten Rohschleimes. Aus der verbliebenen Lösung B konnte — wie durch Vorversuche festgestellt wurde — eine zweite Schleimfraktion B nur durch Fällern nach schwachem Ansäuern mit Mineralsäure (mindestens pH 4) gewonnen werden. Sie ließ sich weder aus reinem Wasser noch aus mit Essigsäure angesäuerter oder mit Alkali basisch gemachter Lösung (durch eine 5fache Menge Aceton oder Alkohol) ausfällen. Nach Waschen und Trocknen mit reinem Aceton ergab Schleimfraktion B ein weißes Pulver.

Eigenschaften und Zusammensetzung der gewonnenen Schleime

Für die qualitative und halbquantitative papierchromatographische Zuckeranalyse der gewonnenen Rohschleime und der Fraktionen A und B wurde die von FORSYTH (1949) angegebene Hydrolysenmethode in der dort beschriebenen Weise übernommen.

Versuche mit verschiedenen Hydrolysenzeiten (4, 12, 24 und 48 Std in 1 n H₂SO₄ bei 100° C) ergaben, daß nach 4 Std Hydrolyse bereits alle Zucker in der gleichen Art und Menge wie nach den längeren Hydrolysenzeiten auftraten. Als Lösungsmittel für eindimensionale Chromatogramme (Papier Schl. & Sch. 2043 b Mgl) wurden neben dem am meisten angewandten System von JERMYN u. ISHERWOOD (1949) Essigester: Wasser: Eisessig (3:3:1) noch die Systeme Butanol:Eisessig: Wasser (4:1:5) (PARTRIDGE 1948) und Butanol: Pyridin: Wasser (3:2:1,5) (SMITH u. POLLARD 1952) verwendet. Die Flecke wurden mit Anilinphthalat (CRAMER 1953) und — zur Prüfung auf Ketozucker und Uronsäuren — mit Naphthoresorcin-Reagens entwickelt.

Schleimfraktion A

Der Umstand, daß Schleimfraktion A schon in sehr geringen Mengen die Viscosität wäßriger Lösungen stark erhöhte und sich durch Zentri-fugieren bei 6000 U/min in reiner wäßriger Lösung absetzte, deutet darauf hin, daß es sich dabei um eine sehr hochmolekulare Substanz handelt. In den Hydrolysaten der gereinigten Fraktion A ließ sich papierchromato-graphisch nur Glucose nachweisen, so daß man es bei diesem Schleim mit einer Polyglucose zu tun hat. Für weitere Untersuchungen reichten die bisher gewonnenen Mengen nicht aus.

Schleimfraktion B

Die Hauptmenge des Rohschleimes bildete Fraktion B. Mit einer 0,2%igen Lösung davon wurde eine Drehungsmessung und eine Viscositätsmessung im Ostwald-Viscosimeter durchgeführt (STROHECKER 1949).

Optische Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Die relative Viskosität wurde als $\eta_{\text{rel.}} = 1,13$ bestimmt ($\eta_{\text{spez.}} = 0,13$).

Für weitere Analysen wurden noch zwei größere Ansätze zur Schleimgewinnung wie oben beschrieben aufgearbeitet und gereinigt, die insgesamt je 538 mg (Tab. 1, Nr. 9) und 422 mg (Tab. 1, Nr. 10) der Schleimfraktion B ergaben. Beide B-Fractionen (9 und 10) sollten genau miteinander verglichen werden, um eine Identität trotz der unterschiedlichen Kulturbedingungen feststellen zu können.

Durch folgende zusätzliche Reinigungsprozedur sollten vor allem noch mitgeschleppte Proteinverunreinigungen davon abgetrennt werden:

Durch folgende zusätzliche Reinigungsprozedur sollten vor allem noch mitgeschleppte Proteinverunreinigungen davon abgetrennt werden:

Die Substanzen wurden je 5 mal hintereinander „enteiweißt“, in dem sie in neutraler bis schwach alkalischer Lösung intensiv mit Chloroform-Butanol im Scheidetrichter geschüttelt wurden (Schleimlösung : Chloroform : Butanol = 1:0,25:0,1 v/v) (SEVAG 1934). Die sich dabei noch in geringem Maße bildenden Emulsionen wurden jedesmal abgetrennt. Daraufhin wurde der Schleim nach Ansäuern mit HCl (pH 4) wieder durch Alkoholzusatz gefällt, der gewaschene Niederschlag durch Kochen in aqua dest. gelöst und von Verunreinigungen durch Zentrifugieren bei 6000 U/min befreit. Beide Schleimlösungen dialysierte man 48 Std gegen aqua dest., fällte aus HCl-angesäuerter Lösung aus und wusch den Niederschlag mehrmals ab, zuletzt mit abs. Äthanol und trocknete bei 60° C. Während die getrockneten pulvrigen Substanzen weiß aussahen, waren ihre wäßrigen Lösungen jedesmal caramellfarbig, ohne ihre Färbung jedoch an irgendein organisches Lösungsmittel abzugeben. Auch waren nach Fällung die überstehenden Lösungen stets wasserhell. Die Trockensubstanzverluste nach dieser zweiten Reinigungsprozedur sind in Tab. 2 angegeben.

An den so gereinigten Schleimfraktionen B 9 u. 10 wurden folgende Analysen durchgeführt: Gesamtstickstoff-Bestimmungen¹ (Tab. 2), Phosphorbestimmungen

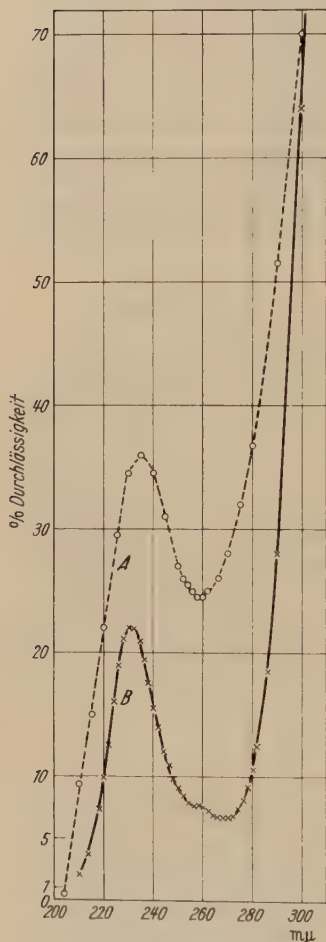


Abb. 1. A UV-Absorptionsspektrum einer 0,0125% igen Lösung der Schleimfraktion B 9 in aqua dest. (o-----o). B UV-Absorptionsspektren 0,025%-iger Lösungen Perchlorsäure-hydrolysierten Schleimfraktionen B 9 u. B 10 (x—x) gelöst in 0,1 n Salzsäure

(gravimetrisch nach PREGEL-ROTH 1947 und colorimetrisch nach

¹ Die Gesamtstickstoff-Analysen führte Herr Dr. PFUNDT im Mikroanalytischen Laboratorium des Organisch-Chemischen Institutes der Universität Göttingen durch.

LANGE 1952) (Tab. 2), qualitativer papierchromatographischer Nachweis von gebundenem Desoxyzucker nach PÖHM u. WEISER (1956), colorimetrische Bestimmung Purin-gebundener Desoxyribose nach DISCHE (1930) (Tab. 3), UV-Absorptionsmessungen (Beckman-Spektralphotometer Modell DU) Abb. 1.

Tabelle 2. *Stickstoff- und Phosphorgehalte der Schleimfraktionen B 9 u. 10*

Schleim	Trockensubstanz- verlust beim 2. Reinigungs- prozeß in %	Gesamtstickstoff in %	Phosphorgehalt in %	
			gravimetrisch	colorimetrisch
B 9	48,4	3,8	6,2	6,0
B 10	54,3	4,9	—	5,8

Das nur durch Ansäuern ermöglichte Ausfällen der Schleimfraktionen B, ihre hohen Phosphor- und Stickstoffgehalte und die UV-Absorptionskurven mit ihren charakteristischen Maxima bei 258—270 m μ und unterhalb 220 m μ (Abb. 1) wiesen darauf hin, daß es sich bei ihnen um Nucleinsäure-ähnliche Verbindungen handeln muß (PAECH u. TRACEY 1955). Es

Tabelle 3. *Die papierchromatographisch bestimmten Bestandteile von Schleimfraktion B der Proben 9 und 10*

Substanzgruppe	identifizierte Komponenten	Mengenverhältnis etwa
Zucker	Galaktose, Glucose, Mannose, Fucose, Ribose, Xylose dazu: Desoxyribose (nach PÖHM u. WEISER 1956 u. DISCHE 1930)	3:3:1:1:0,5:0,1 1 mg Schleim B enthält ebensoviel Purin- gebundene Desoxyribose, wie 0,13 mg DNS reinst (aus Sperma) Bayer
Purin- und Pyrimidinbasen	Guanin, Adenin, Cytosin	2:1:2 etwa 7% der Schleimtrockensubstanz
Aminosäuren	Hexosamine, α , ϵ -Diamino- pimelinsäure, α -Alanin, Glyko- koll, Serin, Glutaminsäure, Threonin dazu geringe Mengen von: Asparaginsäure, Arginin, β -Ala- nin, Valin, Leucin und einige Unbekannte	etwa 2,5% der Schleimtrockensubstanz

wurden deshalb jeweils entsprechend hergestellte Hydrolysate von ihnen auf folgende Substanzgruppen hin papierchromatographisch untersucht:

1. Zucker. Die verwendeten Methoden wurden oben bereits angegeben. Ein Vorhandensein von Ketozuckern oder Uronsäuren wurde ausgeschlossen. Ergebnisse in Tab. 3.

2. Purin- und Pyrimidinbasen. Die verwendeten Methoden sind ausführlich zitiert und dargestellt bei PFENNIG (1957 b). Hydrolysen wurden außerdem noch nach der P_2O_5 -Methode von NARURKAR u. SAHASRABUDHE (1957) vorgenommen. Ergebnisse in Tab. 3.

3. Aminosäuren. Sie wurden in Hydrolysaten (48 Std bei $100^\circ C$ in 1 n H_2SO_4) bestimmt mit der bei PFENNIG (1956) eingehend beschriebenen Methodik. Ergebnisse in Tab. 3.

Diskussion

Vergleicht man die mitgeteilten Ergebnisse über die Bestandteile der Schleimfraktionen A und B mit den bisher von anderen Mikroorganismenschleimen bekannt gewordenen Analysen, so ergeben sich folgende Zusammenhänge: Die Fähigkeit zur Bildung eines nur aus Glucose aufgebauten, hochmolekularen Polysaccharids hat der *Streptomyces*-Stamm mit zahlreichen Bakterien- und Pilzstämmen gemeinsam. Bei diesen Mikroorganismengruppen geht sie auf zwei verschiedene Entstehungsmöglichkeiten zurück, indem solche Polysaccharide einmal durch die lebenden, stoffwechselaktiven Zellen selbst synthetisiert werden, andererseits aber auch in Gegenwart bestimmter Kohlenstoffquellen (z. B. Rohrzucker) davon unabhängig durch Ektoenzyme im Kulturmedium gebildet werden können (RIPPEL-BALDES 1955). Da Schleimfraktion A bei Glycerin und verschiedenen anderen C-Quellen auftrat, muß ihre Bildung an die lebenden Zellen gebunden sein. Dies gilt auch von Schleimfraktion B, welche ebenfalls unabhängig von den gebotenen C-Quellen stets ihre charakteristische Zusammensetzung aufwies. Wenn auch noch nicht endgültig nachgewiesen ist, daß alle in Fraktion B gefundenen Komponenten (Zucker, Purin- und Pyrimidinbasen, Aminosäuren) zu einem festen Komplex chemisch gebunden sind, so weist doch die einheitliche Zusammensetzung unter verschiedenen Kulturbedingungen und das einheitliche Verhalten bei dem intensiv durchgeführten Reinigungsprozeß darauf hin. Schleimfraktion B verhält sich in ihren Fällungseigenschaften ebenso wie Nucleinsäuren, indem sie nur aus angesäuerter Lösung fällbar ist (PAECH u. TRACEY 1955). Würden die Zuckerkomponenten einem unabhängigen Polysaccharidkomplex angehören, so sollten sie sich durch Fällung aus neutraler Lösung abtrennen lassen. In Untersuchungen von SMITHIES u. GIBBONS (1955), TAKAHASHI u. GIBBONS (1957) sowie CATLIN (1956) wurde erstmals nachgewiesen, daß Desoxyribosenucleinsäure als extracelluläre Schleimsubstanz bei halophilen Bakterien in großer Menge gebildet werden kann. In den Kulturlösungen dieser an eine bestimmte Salzkonzentration (0,7—3 Mol NaCl) angepaßten Organismen trat DNS-Schleimabsonderung auf, wenn weniger als 0,7 Mol NaCl geboten wurden.

Bei den Schleimfraktionen B des *Streptomyces*-Stammes fällt im Vergleich zu reinen Nucleinsäuren (1:0,65, WYATT 1951) das ganz anders-

artige Stickstoff-Phosphor-Verhältnis von 1:1,5 auf. Verunreinigung durch anorganisches Phosphat kann nach dem angewendeten Reinigungsvorgang ausgeschlossen werden. Man sollte ein den Nucleinsäuren entsprechendes N:P-Verhältnis finden, wenn es sich bei der Substanz lediglich um ein mit Polysaccharid verunreinigtes Nucleoproteid handelte.

Auf Grund der nach DISCHE (1930) durchgeführten Bestimmung Purin-gebundener Desoxyribose kann noch nicht entschieden werden, ob alle Basen in Schleimfraktion B an Desoxyribose gebunden sind, es sich also um eine DNS-Nucleoproteid-ähnliche Substanz handelt. Da mit der angewandten Polysaccharid-Hydrolysenmethode (1n H₂SO₄, 24 Std, 100° C) aus Nucleinsäuren zwar keinerlei Desoxyribose, wohl aber Ribose abgespalten wird (eigene Versuche), kann es sich bei der papierchromatographisch nachgewiesenen Ribose sowohl um Purin-Pyrimidin-gebundene, wie um polysaccharidisch gebundene Ribose handeln.

Der selbst durch intensive Enteiweißung nicht zu verringernde Proteinanteil des Schleimes hat in seiner Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit den in Zellwandhydrolysaten bei *Streptomyces fradiae* von ROMANO u. NICKERSON (1956) nachgewiesenen Aminosäuren. Ebenso wie bei diesen Autoren fanden sich Hexosamin, α - ϵ -Diaminopimelinsäure und α -Alanin in größter Menge neben den etwas weniger häufigen Glutaminsäure, Serin, Glykokoll, Valin, Arginin u. a. Alle diese Befunde weisen darauf hin, daß das Auftreten des Schleimes B in den Kulturfiltraten des *Streptomyces*-Stammes nicht der Schleimabsonderung vieler anderer Mikroorganismen homolog sein kann. Es liegt die Möglichkeit näher, daß die Ausscheidung eine „pathologische“ Erscheinung ist, indem ein in anormaler Menge gebildeter Bausteincomplex der Zellen (Zellwand?) an das Kulturmedium abgegeben wird.

Es seien nun noch die in den Hydrolysaten der Schleimfraktion B gefundenen Zuckerkomponenten mit denjenigen der Polysaccharide anderer Mikroorganismen verglichen. ANDERSON (1948) gibt an, daß man bei den in die Verwandtschaft der Actinomyceten gehörenden Mycobakterien (*M. tuberculosis* u. a.) ein Polysaccharid isoliert hat, welches nach Hydrolyse neben Arabinose noch Glucose, Galaktose, Mannose und eine Zuckersäure ergab. DZULYNSKA u. Mitarb. (1954) untersuchten zahlreiche Polysaccharide u. a. auch von *M. tuberculosis*- und *Corynebacterium diphtheriae*-Stämmen und fanden in den Hydrolysaten Glucosamin, Glucose und/oder Galactose, Mannose, Arabinose und in etwa 50% der Fälle noch eine Uronsäure. Sie verallgemeinerten ihre an den zwei Arten der Actinomycetales gewonnenen Befunde dahingehend, daß Eubacteriales neben anderen Zuckern Xylose, Actinomycetales hingegen Arabinose in den Schleimen enthalten sollen. Für den hier untersuchten *Streptomyces*-Stamm konnte demgegenüber die Anwesenheit von Arabinose ausgeschlossen

werden, so daß die Verallgemeinerung der Anwesenheit von Arabinose bei *Actinomycetales* zu weitgehend ist.

Fucose ist offenbar keine seltene Komponente der Schleimsubstanzen von Mikroorganismen, denn sie wurde in neuester Zeit in den Polysacchariden zahlreicher Bakterien, Grünalgen und Pilze nachgewiesen.

Bacillus polymyxa (MISAKI u. Mitarb. 1954), *Lactobacillus bifidus* (NORRIS u. Mitarb. 1954), *Pseudomonas fluorescens*-Stämme (EAGON u. DEDONDER 1955), *Klebsiella*-Stämme (WILKINSON u. Mitarb. 1955), *Aerobacter-Klebsiella*-Stämme (neben hauptsächlich vorkommender Glucose, Uronsäure und Galaktose), *Salmonella*-Arten und *Chromobacterium violaceum* (neben Galaktose, Glucose und Glucosamin) (DAVIES 1955), *Chlamydomonas*-Arten (LEWIN 1956).

MARTIN u. ADAMS (1956) gaben in ihren Untersuchungen der Polysaccharide von Pilzen eine Zusammenstellung der verschiedenen Zuckerkomponenten bei 31 Arten der *Mucoraceae*, *Chaetomiaceae* und *Fungi Imperfecti*. Fucose (neben Glucuronsäure, Galaktose, Glucose, Mannose und teilweise Ribose) fanden sie nur in extra- und intracellulären Polysacchariden von *Mucor*- und *Rhizopus*-Arten. Dabei war das Vorhandensein der Glucuronsäure auf die extracellulären, dasjenige des Glucosamins auf die intracellulären Polysaccharide beschränkt, bei denen neben Galaktose und Ribose zudem etwa gleiche Mengen Mannose und Fucose gefunden wurden. Hinsichtlich der Art der Zuckerbausteine ist also Schleim B des *Streptomyces*-Stammes den intracellulären Polysacchariden von *Mucoraceen* vergleichbar.

Es ist beabsichtigt, die in der vorliegenden Mitteilung noch offen gebliebenen Fragen durch weitere Analysen zu klären. Darüber hinaus sollen weitere *Streptomyces*-Stämme auf Vorkommen und Art von extracellulärem Schleim hin untersucht werden, um die zunächst nur bei einem einzigen Stamm gewonnenen Ergebnisse in Zusammenhang mit den bei anderen Stämmen der gleichen Gattung vorliegenden Verhältnissen bringen zu können.

Zusammenfassung

Aus den viscosen Kulturfiltraten eines *Streptomyces*-Stammes ließen sich nach intensiver Reinigung zwei verschiedene Schleimfraktionen (A und B) gewinnen (erstmaliger Befund bei Streptomyceten).

Die Schleimbildung war unabhängig von den angewendeten Kohlenstoffquellen, da aus allen Wachstum ermöglichenden Kulturlösungen mit folgenden C-Quellen gleichartig zusammengesetzte Schleimpräparate isoliert werden konnten: Glycerin, Glucose, Galaktose, Mannose, Mannit, Maltose und Lactose.

Schleimfraktion A erwies sich als eine die Viskosität ihrer Lösungen stark erhöhende (hochmolekulare) Polyglucose.

In jeweils entsprechend hergestellten Hydrolysaten der weniger viscosität erhöhend wirkenden Schleimfraktion B wurden papierchromato-

graphisch folgende Zucker, Purin- und Pyrimidinbasen und Aminosäuren nachgewiesen:

Galaktose, Glucose, Mannose, Fucose, Ribose und Spuren von Xylose (daneben gebundene Desoxyribose);

Guanin, Adenin, Cytosin;

Hexosamine, α, ϵ -Diaminopimelinsäure, α -Alanin, Glykokoll, Serin, Glutaminsäure, Threonin u. a.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES danke ich für sein stetes Interesse an der Arbeit. Herrn Dr. D. CLAUS bin ich für anregende Diskussionen über Schleimbildung bei Mikroorganismen dankbar.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft ist die Gewährung von Sachbeihilfen für die Durchführung der Arbeit zu verdanken.

(Teilergebnisse aus der Habilitationsschrift der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.)

Literatur

ANDERSON, C. G.: An introduction to bacteriological chemistry. Edingburgh: E. u. S. Livingstone Ltd. 1948.

BALDACCI, E., C. SPALLA u. A. GREIN: Arch. Mikrobiol. **20**, 347 (1954). — BROCKMANN, H., u. N. PFENNIG: Z. physiol. Chem. **292**, 77 (1953). — BURGER, M.: Bacterial polysaccharides. Springfield Ill. USA: Ch. C. Thomas Publ. 1950.

CATLIN, B. W.: Science (Lancaster, Pa.) **124**, 441 (1956). — CRAMER, F.: Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie 1953.

DAVIES, D. A. L.: Biochemic. J. **59**, 696 (1955). — DISCHE, Z.: Mikrochemie **8**, 4 (1930). — DZULYNSKA, J., u. E. MICULASZEK: Bull. Acad. Polonaise Sci. Cl. II, **2**, 101 (1954).

EAGON, R. G., et R. DEDONDER: C. r. Acad. Sci. (Paris) **241**, 527 u. 579 (1955). — EVANS, T. H., and H. HIBBERT: Adv. Carbohydrate Chem. **2**, 204 (1946).

FORSYTH, W. G. C., and D. M. WEBLY: Biochemic. J. **44**, 455 (1949). — FOSTER, J. W.: Chemical activities of fungi. New York: Acad. Press. 1949.

HOCKENHULL, D. J. D., K. H. FANTES, M. HERBERT and B. WHITEHEAD: J. Gen. Microbiol. **10**, 353 (1954).

JERMYN, M. A., and F. A. ISHERWOOD: Biochemic. J. **44**, 402 (1949). — JONES, J. K. N.: Annual Rev. Biochem. **24**, 113 (1955).

O'KANE, D. J.: Annual Rev. Microbiol. **10**, 275 (1956).

LANGE, B.: Colorimetrische Analyse, S. 334. Weinheim: Verlag Chemie 1952. — LEWIN, R. A.: Canad. J. Microbiol. **2**, 665 (1956). — LIESKE, R.: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Leipzig: Gebr. Borntraeger 1921.

MARTIN, S. M., and G. A. ADAMS: Canad. J. Microbiol. **2**, 715 (1956). — MRS. SAKI, A., I. HORI and S. TERAMOTO: J. ferment. Technol. (Japan) **32**, 311 (1954). — MONTGOMERY, R., and F. SMITH: Annual Rev. Biochem. **21**, 79 (1952).

NARURKAR, M. V., and M. B. SAHASRABUDHE: Biochim. et Biophysica Acta **23**, 367 (1957). — NORRIS, R. F., M. DE SIPIN, F. W. ZILLIKEN, T. S. HARVEY and P. GYÖRGY: J. Bacter. **67**, 159 (1954).

OLIVER-GONZÁLEZ, J.: Annual Rev. Microbiol. **8**, 353 (1954).

PAECH, K., u. M. V. TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. 4. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955. — PARTRIDGE, S. M.: Biochemic. J. **42**, 238 (1948). — PFENNIG, N.: Diss. math.-nat. Fakultät Göttingen (1952). —

Arch. Mikrobiol. **25**, 109 (1956). — Habil.schrift. Landw. Fakultät Univ. Göttingen 1957a. — Naturwissenschaften, **44**, 537 (1957b). — PÖHM, M., u. R. WEISER: Naturwissenschaften **43**, 582 (1956). — PORTER, J. R.: Bacterial chemistry and physiology. New York: John Wiley and Sons 1946. — PREGL, F., u. H. ROTH: Quantitative organische Mikroanalyse. Wien: Springer 1947.

RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. 3. Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955. — ROMANO, A. H., and W. J. NICKERSON: J. Bacter. **72**, 478 (1956).

SEVAG, M. G.: Biochem. Z. **273**, 419 (1934). — SMITHIES, W. R., and N. E. GIBBONS: Canad. J. Microbiol. **1**, 614 (1955). — SMITH, P. B., and A. L. POLLARD: J. Bacter. **63**, 129 (1952). — SPRINGER, G. F.: Polysaccharides in biology. The Josiah Macy, jr. Foundation 1955. — STACEY, M.: Adv. Carbohydrate Chem. **2**, 162 (1946). — STROHECKER, R.: Methoden der Lebensmittelchemie. Berlin: Walter de Gruyter u. Co. 1949.

TAKAHASHI, I., and N. E. GIBBONS: Canad. J. Microbiol. **3**, 687 (1957). — THIMANN, K. V.: The life of bacteria. New York: The Macmillan Company 1955. — TOMCSIK, J.: Annual Rev. Biochem. **22**, 351 (1953).

WAKSMAN, S. A.: The Actinomycetes. Annales Cryptogamici et Phytopathologici Vol. 9, Waltham. Mass. USA 1950. — WHISTLER, R. L., and D. I. MCGILVRAY: Annual Rev. Biochem. **23**, 79 (1954). — WILKINSON, J. F., W. F. DUDMAN and G. O. ASPINALL: Biochem. J. **59**, 446 (1955). — WYATT, G. R.: Biochem. J. **48**, 584 (1951).

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Das Leben der Gewächse

Ein Lehrbuch der Botanik. Von Dr. **Friedrich Oehlkers**, o. Professor der Botanik an der Universität Freiburg i. Br. In zwei Bänden.

Erster Band: **Die Pflanze als Individuum**. Mit 523 Textabbildungen. VIII, 463 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 39,60

Zweiter Band in Vorbereitung.

Aus den Besprechungen: ... Der Verfasser hat versucht, die einzelnen Typen des Pflanzenreichs von ihrem Entstehen bei der Fortpflanzung bis zu ihrem natürlichen Ende durch den Tod in ihrem Zusammenhang darzustellen. Dieses Bestreben bringt es mit sich, daß Morphologie, Entwicklungsgeschichte, Genetik und Physiologie nicht mehr scharf nebeneinander stehen, sondern vielfach ineinander übergehen. Dadurch wird zweifellos das Verständnis der Zusammenhänge erleichtert, indem Dinge, die anderswo beziehungslos nebeneinander stehen oder nur am Rande erwähnt werden, miteinander in Verbindung gebracht werden. Auch bleibt dem Leser dabei immer bewußt, daß von lebenden Organismen die Rede ist ... Ein weiterer Vorzug in didaktischer Hinsicht scheint dem Referenten in der von spürbarer Begeisterung getragenen ausführlichen Beschreibung zu liegen, die das originelle Buch zu einem wirklich leserlichen Lernbuch macht. Das Verständnis wird dabei durch zahlreiche Abbildungen erleichtert, unter denen sich hervorragende Originale befinden. Fast immer wird nicht nur gesagt, daß etwas so ist, sondern auch, warum es so ist ... Hervorzuheben wäre noch, daß bei der Lektüre des Buches nicht der Eindruck erweckt wird, daß schon alles erforscht sei.

„Zeitschrift für Naturforschung“

Protozoologie

Von Karl G. Grell, apl. Professor für Zoologie und wissenschaftliches Mitglied am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen. Mit 300 Abbildungen. VII, 284 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 59,—

Inhaltsübersicht: **Einleitung.** — **Abgrenzung und Begriff.** — **Morphologie.** Das Cytoplasma. Die Zellmembran. Der Zellkern. — **Fortpflanzung.** Äquale Zellteilung. Inäquale Zellteilung. Reorganisation. — **Befruchtung und Geschlechtlichkeit.** Gametogamie. Gamontogamie. Parthenogenese. — **Generationswechsel.** — **Modifikabilität.** — **Vererbung.** Kreuzungsversuche. Mutationen. Langdauernde Veränderungen in Klonen. — **Bewegung.** Ortsveränderung. Gestaltveränderung. — **Verhalten.** — **Ernährung.** — **Parasitismus und Symbiose.** — **Formenübersicht.** I. Klasse: Flagellata. 1. Ordnung: Chrysomonadina. 2. Ordnung: Cryptomonadina. 3. Ordnung: Phytomonadina. 4. Ordnung: Euglenoidina. 5. Ordnung: Dinoflagellata. 6. Ordnung: Protomonadina. 7. Ordnung: Diplomonadina. 8. Ordnung: Polymastigina. 9. Ordnung: Opalinida. II. Klasse: Rhizopoda. 1. Ordnung: Amoebina. 2. Ordnung: Testacea. 3. Ordnung: Heliozoa. 4. Ordnung: Radiolaria. 5. Ordnung: Foraminifera. III. Klasse: Sporozoa. 1. Ordnung: Gregarinida. 2. Ordnung: Coccidia. IV. Klasse: Ciliata. 1. Unterklasse: Euciliata. 1. Ordnung: Holotricha. 2. Ordnung: Spirotricha. 3. Ordnung: Peritricha. 4. Ordnung: Chonotricha. 2. Unterklasse: Suctoria. — **Veröffentlichungen.** Zusammenfassende Darstellungen. Einzelarbeiten und Werke aus Nachbargebieten. Filme. — **Sachverzeichnis.** — **Artenverzeichnis.**

Aus den Besprechungen: Unter der Protistenliteratur nimmt Grells „Protozoologie“ eine Sonderstellung ein, führt sie uns doch unter Berücksichtigung der neuesten, noch im Fluß befindlichen Untersuchungen, unbelastet durch systematische Weitschweifigkeiten, in alle diejenigen Tatsachen morphologischer, physiologischer, genetischer und ökologischer Natur ein, die für eine allseitige Beurteilung des Protozoenorganismus wesentlich sind und deren Bedeutung für die derzeit aktuellen biologischen Probleme nicht nachdrücklich genug herausgestellt werden kann. Grundlage der meisterhaft geraushten Darstellung sind Vorlesungen des Verfassers an der Universität Tübingen. Die dadurch gegebene didaktische Durcharbeitung des Stoffes zusammen mit der besonders eindrucksvollen Behandlung der in das engere Forschungsprogramm des Max-Planck-Instituts für Biologie fallenden, die Fortpflanzungsphysiologie umfassenden Fragen verleihen dem Buch eine wertvolle persönliche Note . . .

Eine besondere Würdigung verdient die bildliche Ausstattung des Grellschen Buches. Was da an Abbildungen geboten wird, ist sachlich, zeichnerisch und drucktechnisch gleichermaßen hervorragend. In der Auswahl der fremden Vorlagen und der reichlichen Beigabe von Originalzeichnungen und technisch vollendeter Mikrophotographien zeigt sich so richtig das „In-der-Materie-Stehen“ des Verfassers. Allein das Abbildungsmaterial rechtfertigte schon dieses Werk, das sein Verfasser seinem Lehrer Max Hartmann gewidmet hat. Grells Wunsch, seine Protozoologie möge dazu beitragen, das unter den deutschen Biologen immer mehr in Schwinden begriffene Interesse an Protozoen neu zu beleben, dürfte sicherlich Erfüllung finden.

„Protoplasma“

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG